

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Fisiología



**MODULACIÓN SEROTONÉRGICA DE LAS CRISIS
EPILÉPTICAS TEMPORALES EN UN MODELO DE
KINDLING QUÍMICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José Julián Javela González

Bajo la dirección de los doctores
Miguel Ángel Pozo García
Eduardo D. Martín Montiel
Carmen González García

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-1004-9

©José Julián Javela González, 2011



MODULACIÓN SEROTONÉRGICA DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS TEMPORALES EN UN MODELO DE KINDLING QUÍMICO

**Tesis Doctoral presentada por:
José Julián Javela González**

Madrid, 2011

**TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
NEUROCIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina - Departamento de Fisiología
Instituto Pluridisciplinar - Unidad de Cartografía Cerebral**

Tesis dirigida por:

Dr. Miguel Ángel Pozo García.

Dr. Eduardo D. Martín Montiel.

Dra. Carmen González García.

A Sofía mi esposa y a mi padre.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo agradecer a mi esposa Sofía por todos estos años de amor, paciencia, compañía y lucha constante en busca de un sueño, que en su momento parecía imposible de alcanzar. Nuevamente gracias, porque de no ser por tu ayuda tengo muy claro, que no estaría ahora mismo escribiendo este importante capítulo de mi vida.

A mi padre, quien sin saberlo inspiró mi deseo de conocer el mundo de las neurociencias.

Agradezco también a mis directores de tesis, especialmente a Miguel Ángel Pozo, Eduardo D. Martín Montiel y Carmen González García, por su constante orientación y por saber encaminar mi formación en la electrofisiología. A ellos gracias, no solo porque encontré unos excelentes maestros, sino que también unos grandes amigos.

Igualmente, agradezco a Pablo Bascuñana, por su constante ayuda en muchos de los experimentos realizados y por acompañarme en las largas tardes mientras esperábamos que una rata “hiciera algo”. A Rubén Fernández por su permanente colaboración y claro como olvidar su copyright por las fotos realizadas durante las cirugías de implantación de los electrodos, las cuales están expuestas en esta tesis. A Mercedes Delgado y Luís García, por su continua colaboración y disposición ante mis constantes dudas. Así mismo, no puedo dejar de mencionar a todas y cada una de las personas que conocí en el Instituto Pluridisciplinar y las cuales de manera directa o indirecta aportaron su grano de arena en la construcción de este sueño como lo son: Sonia Díaz Pacheco (por tantas preguntas que me hacías en relación a la epilepsia y electrofisiología... al final siempre me ponías a mirar nuevamente la literatura), Ana, Héctor, Concha, Danila, Ismael, Irene, José Antonio, Tino, José Ángel, Anne, Marisol y Paquita, Paula, espero no pecar por omisión y no quiero dejar a nadie por fuera. Realmente deseo poder seguir compartiendo mis historias que aunque parecieran increíbles en muchas oportunidades, son tan reales como mis agradecimientos.

Por otra parte, no puedo dejar de mencionar a toda mi gente en Colombia: especialmente a Doña María y Germán, así como a mi familia: Rebeca, Matías (padres adoptivos), así como a mis primos y hermanos: Pedro Nel, Juan Carlos, Pilar y mi madre; acepto que aunque casi nunca los llamé durante todos estos años, siempre los llevé en mi corazón.

Finalmente, agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca FPI, al Instituto Pluridisciplinar por abrirme sus puertas y especialmente a la Unidad de Cartografía Cerebral donde desarrollé mi labor formativa, así como mis experimentos.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia Español (SAF2005-02033) y (SAF2009-09020). José Julián Javela González fue becario FPI con referencia (BES-2006-12866).

ÍNDICE GENERAL

PRÓLOGO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

I.	INTRODUCCIÓN	10
1	GENERALIDADES SOBRE LA EPILEPSIA	11
1.1	Breve evolución histórica de la epilepsia	11
1.2	Concepto y prevalencia de la epilepsia	12
1.3	Clasificación de las epilepsias	13
2	EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL (ELT)	16
2.1	La electroencefalografía (EEG) y epilepsia	17
2.1.1	Las descargas epilépticas intercríticas (DEI)	18
2.1.2	Patrón electroencefalográfico paroxístico ictal (PPI)	19
2.2	La Tomografía por Emisión de Positrones (PET)	20
2.2.1	Ciclo de la FDG y metabolismo neurona-glía	21
2.2.2	Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y epilepsia	22
2.3	Imagen de Resonancia Magnética (MRI) y epilepsia	26
2.4	Autorradiografía y epilepsia	28
3	MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL	29
3.1	Kindling eléctrico	29
3.2	Kindling químico con pentilentetrazol	30
3.2.1	Generalidades del modelo de kindling con pentilentetrazol	31
3.2.2	Ventajas del kindling con pentilentetrazol	31
3.2.3	Estructuras implicadas en el desarrollo del kindling con pentilentetrazol	32
3.2.4	Valoración del comportamiento con pentilentetrazol	33
3.2.5	Estudios de neuroimagen con pentilentetrazol	33
4	FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA	34
4.1	Participación del GABA en la epilepsia	35
4.2	Participación del glutamato en la epilepsia	36
5	SISTEMA SEROTONÉRGICO	37
5.1	Las neuronas serotoninérgicas	38
5.2	Receptores de 5-HT	39
5.3	El receptor 5-HT ₁	40
5.4	El receptor 5-HT ₂	42
5.5	El receptor 5-HT ₇	44

5.6	Autoreceptores serotoninérgicos	45
5.7	5-HT en el Núcleo del Rafe Dorsal (NRD) y Medial (NMR)	45
5.8	Proyecciones serotoninérgicas al Núcleo del Rafe Dorsal y Medial	46
5.8.1	Aferencias del Núcleo del Rafe	46
5.8.2	Eferencias del Núcleo del Rafe	47
5.9	5-HT en el hipocampo	49
5.10	Proyecciones serotoninérgicas al hipocampo	49
5.10.1	Aferencias al hipocampo	49
5.10.2	Eferencias del hipocampo	50
5.11	Participación de la serotonina en la epilepsia	51
5.12	Participación de receptores 5-HT _{1A} , 5HT _{2C} y 5HT ₇ en la epilepsia	52
II.	OBJETIVOS	56
1.	Objetivos generales	57
2.	Objetivos específicos	58
III.	MATERIAL Y METODOS	59
1.	ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL RAPE (NMR) EN UN MODELO DE KINDLING QUÍMICO	60
1.1	Sujetos y grupos experimentales	61
1.2	Fármacos	62
1.3	Kindling químico y valoración comportamental	63
1.4	Implantación de electrodos en los estudios sistémicos	63
1.4.1	Adquisición de datos y estimulación del Núcleo Medial del Rafe (NMR) en estudios sistémicos	66
1.5	Implantación de electrodo/guía intracerebral <i>in vivo</i> para estudios con microperfusión	67
1.5.1	Adquisición de datos mediante microperfusión intracerebral	68
1.6	Análisis estadístico	68
2.	ESTUDIO DE MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL RAPE (NMR) EN UN MODELO DE STATUS EPILEPTICUS EN RATAS	70
2.1	Sujetos y grupos experimentales	71
2.2	Modelo de status epilepticus (SE) mediante pentilentetrazol (PTZ) y valoración comportamental	71
2.3	Implantación de electrodos y estimulación en el Núcleo Medial del Rafe (NMR) en animales jóvenes	72
2.4	Análisis estadístico	73

3.	ESTUDIO MEDIANTE TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET) DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS QUE SUCEDEN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN UN MODELO DE EPILEPSIA <i>IN VIVO</i> POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE PENTILENTETRAZOL (PTZ)	74
3.1	Sujetos y grupos experimentales	75
3.2	Equipo de Micro-PET	75
3.3	Modelo de kindling químico y evaluación comportamental	76
3.4	Estudios de adquisición estática de PET	76
3.5	Análisis de datos obtenidos con el Micro-PET	77
3.6	Estudios de adquisición dinámica de PET	78
3.6.1	Implantación de electrodos	78
3.6.2	Método de adquisición dinámica de PET	78
3.7	Análisis estadísticos de resultados estáticos y dinámicos	79
4.	ESTUDIO DE FIJACIÓN DE RADIOLIGANDOS MEDIANTE AUTORADIOGRAFÍA EN ANIMALES TRATADOS CON PENTILENTETRAZOL (PTZ)	80
4.1	Sujetos y grupos experimentales	81
4.1.1	Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con ¹⁸ MPPF	81
4.2	Estudios autorradiografico con ¹⁸ MPPF y ¹⁸ F-FDG en una <i>rata ex- vivo</i>	82
4.2.1	Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con ¹⁸ MPPF y ¹⁸ F-FDG	82
4.3	Captura de imágenes y análisis de datos	83
4.3.1	Tinción de Nissl	83
IV.	RESULTADOS	84
1.	ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL RAPE (NMR) EN UN MODELO DE KINDLING QUÍMICO	85
1.1	Análisis electroencefalográfico del kindling con pentilentetrazol	86
1.1.1	Cambios comportamentales y correlación electroencefalográfica	86
1.2	La estimulación del Núcleo Medial de Rafe reduce la actividad convulsiva inducida por pentilentetrazol	89
1.3	El efecto antiepiléptico de la estimulación del Núcleo Medial del Rafe (NMR) es mediado por receptores serotoninérgico 5-HT _{1A} , 5-HT _{2C} y 5HT ₇	91
1.4	Efecto de antagonistas serotoninérgicos administrados mediante microperfusión en crisis convulsivas inducidas con PTZ	97

2.	ESTUDIO DE MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL RAJE (NMR) EN UN MODELO DE STATUS EPILEPTICUS EN RATAS	99
2.1	Análisis electroencefalográfico del <i>SE</i> inducido con pentilentetrazol (PTZ)	100
2.2	La estimulación del Núcleo Medial de Rafe elimina el establecimiento del SE inducido por pentilentetrazol	101
3.	ESTUDIO MEDIANTE TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET) DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS QUE SUCEDEN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN UN MODELO DE EPILEPSIA <i>IN VIVO</i> POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE PENTILENTETRAZOL (PTZ)	104
3.1	Estudios de adquisición estáticos de PET durante la actividad metabólica intercrítica	105
3.2	Estudios de adquisición dinámicos de PET durante la actividad metabólica en el periodo crítico	108
4.	ESTUDIO DE FIJACIÓN DE RADIOLIGANDOS MEDIANTE AUTORADIOGRAFÍA EN ANIMALES TRATADOS CON PENTILENTETRAZOL (PTZ)	112
4.1	Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con ¹⁸ MPPF	113
4.2	Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con ¹⁸ MPPF y ¹⁸ F-FDG	114
V.	DISCUSIÓN	117
VI.	CONCLUSIONES	132
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de las epilepsias según ILAE, 1981.
Tabla 2.	Clasificación internacional de las epilepsias ILAE, 1989.
Tabla 3.	Fármacos empleados en los experimentos.
Tabla 4.	Porcentaje de animales, en diferentes condiciones experimentales que alcanzan convulsiones tónico-clónicas (Estadios 4 y 5) en experimentos sistémicos.
Tabla 5.	Número de estímulos y eventos durante las crisis inducidas con PTZ.
Tabla 6.	Porcentaje de animales en diferentes condiciones experimentales que alcanzan convulsiones tónico-clónicas (Estadios 4-5) microperfusión.
Tabla 7.	Porcentaje de animales, en diferentes condiciones experimentales, que alcanzan <i>SE</i> .
Tabla 8.	Protocolos de estimulación del Núcleo Medial del Rafe (NMR) empleados en investigaciones anteriores.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del metabolismo de la FDG.
Figura 2.	Organización molecular del receptor de 5-HT _{1A} .
Figura 3.	Neuronas serotoninérgicas a lo largo de la línea media del tronco encefálico.
Figura 4.	Las tres vías aferentes principales del hipocampo.
Figura 5.	Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR A. Set-Up de electrofisiología. B Animal bajo anestesia.
Figura 6.	Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR A. Ubicación del Bregma. B Fijación de tornillos al cráneo.
Figura 7.	Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR A. Implantación del electrodo monopolar B. implantación del electrodo de registro.
Figura 8.	Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR A. Electrodos implantados. B. Set-Up de registro in vivo.
Figura 9.	Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos/guía en CA1 del hipocampo para la microperfusión. A. Ubicación del bregma B. Esquema de una sonda de diálisis.
Figura 10.	Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos/guía en CA1 del hipocampo para la microperfusión. AB. Implantación de electrodos/guía monopolar.
Figura 11.	Tomógrafo Albira PET de Onco Vision – Unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar – UCM.
Figura 12.	Representación cronológica del estudio estático.
Figura 13.	Registro electroencefalográfico durante los estadios 0 y 1 respectivamente con ocasionales ondas rítmicas agudas de entre 4-5 Hz.

- Figura 14. Registro electroencefalográfico durante el estadio 2 (ondas convulsivas o espasmos) con ondas rítmicas agudas de entre 5-7 Hz.
- Figura 15. Registro electroencefalográfico durante el estadio 3 (sacudidas mioclónicas en las extremidades anteriores y postura de canguro) con continuas espigas y complejas ondas que fluctúan entre los 10-12 Hz.
- Figura 16. Registro electroencefalográfico durante el estadio 3 y 5 con continuas espigas que fluctúan entre los 20-30 Hz.
- Figura 17. Registro electroencefalográfico durante la depresión post ictal luego de una crisis.
- Figura 18. Supresión de la actividad convulsiva inducida con pentilentetrazol mediante la estimulación del NMR.
- Figura 19. Gráfica de los diferentes grupos experimentales con antagonistas serotoninérgicos. Umbral y latencia de las crisis.
- Figura 20. Gráfica de los diferentes grupos experimentales con antagonistas serotoninérgicos administrados mediante. Número y duración de crisis.
- Figura 21. Número medio de estímulos generados en grupos experimentales.
- Figura 22. Gráficas de diferentes grupos experimentales con antagonistas administrados mediante microperfusión.
- Figura 23. Registro electroencefalográfico durante el SE con continuas espigas y complejas ondas que fluctúan entre los 20-30 Hz.
- Figura 24. Gráfica de los grupos control y con estimulación del NMR en ratas jóvenes con SE.
- Figura 25. Imágenes PET de un mismo individuo con tratamiento basal y con administración de pentilentetrazol.
- Figura 26. Representación en un gráfico de barras del promedio de captación de FDG en mCi/cc de las diferentes estructuras analizadas del cerebro en cada grupo experimental.
- Figura 27. Gráfica que muestra disminución de consumo de glucosa cerebral con FDG.
- Figura 28. Registro electroencefalográfico en región CA1 de hipocampo tras una crisis inducida con 70 mg/kg de PTZ.
- Figura 29. Gráfica de incorporación de FDG en un animal.
- Figura 30. Representación en un gráfico de barras del promedio de la constante K_i en unidades 1/min de las diferentes estructuras analizadas del cerebro en cada grupo experimental.
- Figura 31. Gráficas de barras de la constante K_i media por grupo experimental de las estructuras de mayor diferencia entre dos tratamientos.
- Figura 32. Estructuras anatómicas de registro y estimulación del NMR.
- Figura 33. Imagen autorradiográfica de una rata exvivo en una escala de frío.

RELACIÓN DE ABREVIATURAS

AD: Afterdischarge.

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid *receptor*.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATV: Área tegmental ventral.

CA1: Área CA1 del hipocampo.

CA2: Área CA2 del hipocampo.

CBF: Flujo sanguíneo cerebral.

DBS: Estimulación cerebral profunda.

DEI: Descargas epilépticas intercríticas.

DSC: Descargas en punta-onda.

GABA: Ácido gama-amino butírico.

GABA_A: Receptor a GABA Tipo A.

GEPRs: Ratas propensas genéticamente a epilepsia.

CPF: Corteza prefrontal.

EEG: Electroencefalografía.

FCE: Fluido Cerebroespinal Artificial.

fEPSP: Potencial de campo excitatorio post sináptico.

ELT: Epilepsia del Lobulo Temporal.

MRI: Imagen de Resonancia Magnética.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

NDR: Núcleo Dorsal del Rafe.

NMDA: (N-metil-D-Aspartato).

NMR: Núcleo Medial del Rafe.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LFS: Estimulación eléctrica de baja frecuencia.

LC: Locus coeruleus.

NA: Noradrenalina.

NR: Núcleo del rafe.

MAO: Monoamino oxidasa.

PET: Tomografía por Emisión de Positrones.

PPI: Patrón electroencefalográfico paroxístico octal.

PTZ: Pentilentetrazol.

ELTL: Epilepsia del Lobulo Temporal Lateral.

ELTM: Epilepsia del Lobulo Temporal Medial.

SE: Status epilepticus.

IBE: Oficina Internacional para la Epilepsia.

I.P: Intraperitoneal.

ILAE: Liga Internacional contra la Epilepsia.

ISRS: Inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina.

RMe: Resonancia Magnética Estructural.

RMNf: Resonancia Magnética Nuclear Funcional.

SEM: Error Estándar de la Media.

SNC: Sistema Nervioso Central.

TSV: Tinciones Sensibles a Voltaje.

VOIs: Volumen de las regiones de interés

WAY100635: [N-[2-[4-(2-Metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinilciclohexanocarboxamida].

WDS: Sacudidas de perro.

5-HT: 5-hidroxitriptamina.

I. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES SOBRE LA EPILEPSIA

1.1 Breve evolución histórica de la epilepsia

Las convulsiones han fascinado y preocupado a la humanidad desde la antigüedad, en la época de Hipócrates por ejemplo (aproximadamente 400 años a. de C) los griegos eran consciente de la relación que existía entre las lesiones de la cabeza y la actividad convulsiva que afectaba al lado contrario del cuerpo; sin embargo, a pesar de la asociación observada con las lesiones físicas se mantenía la idea de que la enfermedad era producto de posesiones de espíritus malignos o de castigo de los dioses. En respuesta a la enfermedad se recomendaba una terapia basada en tres puntos: dieta, regulación de las excreciones y gimnasia terapéutica. Así mismo, en menor medida se empleaban “medicamentos”, que eran, prácticamente, hierbas medicinales.

Durante la Edad Media se olvidaron los conocimientos que se tenían sobre el origen natural de la enfermedad y se volvió a creer que el origen de la epilepsia era algo sobrenatural y que su aparición se debía a la influencia de espíritus malignos y de los demonios, así, de acuerdo con el pensamiento de la época, el tratamiento se basaba principalmente en rezos, ayunos, ofrendas y peregrinaciones. Posteriormente, durante el renacimiento, se empleaban cada vez más, junto a los componentes de las plantas medicinales, sustancias químicas definidas como “remedios contra las convulsiones”. Las más significativas eran: el cobre (utilizado ya en la antigüedad), el óxido de zinc, el nitrato de plata, el bismuto y el estaño (García-Albea, 2007).

El análisis moderno de la epilepsia se inicio con el trabajo de John Hughlings Jackson en el Hospital de Quenn Square de Londres entre la década de 1860-1870. Jackson se percató que las crisis epilépticas no implicaban necesariamente pérdida de la conciencia, si no que podían estar asociadas a síntomas focales, como sacudidas de brazos. Este es considerado el primer reconocimiento de lo que actualmente llamamos crisis parciales (focales). Por otro lado, un avance importante fue el primer tratamiento quirúrgico de la epilepsia realizado por Victor Horsley, quien en 1886 extirpó la corteza

adyacente a una fractura craneal deprimida y curó a un paciente con crisis motoras focales. Sin embargo, no es hasta el año 1934 cuando Wilder Penfield y Herbert Jasper en el Instituto Neurológico de Montreal (Canadá) generan toda una metodología para el diagnóstico y tratamiento quirúrgico de las epilepsias parciales basándose en el registro directo de la actividad eléctrica de la corteza cerebral expuesta durante el acto quirúrgico. Las innovaciones médicas comprenden en 1912 el empleo por primera vez del fenobarbital como anticonvulsivo por Hauptmann, el desarrollo de la electroencefalografía en 1929 y el descubrimiento de la fenitoína por Houston Merritt y Tracey Putnam en 1937 (López-Muñoz et al., 2005; Westbrook, 2000). En la actualidad el estudio y entendimiento de la epilepsia han avanzado considerablemente gracias al empleo de las nuevas técnicas exploración, sin embargo aún se desconocen muchos factores que rodean tanto la epileptogénesis como el establecimiento y la recurrencia.

1.2 Concepto y prevalencia de la epilepsia

La Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE) y la Oficina Internacional para la Epilepsia (IBE) han llegado a un consenso para las definiciones de los términos **crisis epiléptica** y **epilepsia**. Una **crisis epiléptica** es *una ocurrencia transitoria de signos y/o síntomas debido a la anormalidad excesiva o sincronismo neuronal de la actividad cerebral*. Y la **Epilepsia** es *un desorden del cerebro caracterizado por una permanente predisposición a generar **crisis epilépticas** y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas, y sociales de esta condición*. Igualmente, la definición de epilepsia requiere la ocurrencia de al menos una crisis epiléptica (Fisher et al., 2005; Berg et al., 2010).

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la epilepsia es definida como *“afección crónica producida por diferentes etiologías, caracterizada por la repetición de crisis debidas a una descarga excesiva de las neuronas cerebrales (crisis epiléptica) asociadas eventualmente a síntomas clínicos o paraclínicos”*. Igualmente, define epilepsia como *“condición caracterizada por crisis epilépticas recurrentes (dos o más) no provocadas por alguna causa inmediatamente identificable”* (Gastaut, 1976).

Los estudios epidemiológicos estiman que al menos el 0.5-2 % de la población mundial padece de epilepsia (Juul-Jensen y Foldspang, 1983; Thon et al., 2008) y el 20-50 % de estos pacientes no responden a los fármacos antiepilépticos y no son candidatos para cirugía de epilepsia (Theodore y Fisher, 2004; Bialer et al., 2007). La OMS señala que la proporción estimada de la población general con epilepsia activa (es decir, ataques continuos o necesidad de tratamiento en algún momento) oscila entre 4-10 %. Así mismo, cerca del 90% de los casos mundiales de epilepsia se registran en poblaciones en vía de desarrollo. Finalmente, la OMS indica que la aparición de un ataque no implica padecer la enfermedad (hasta un 10% de la población mundial sufre algún ataque en su vida), la epilepsia se define por dos o más ataques no provocados.

1.3 Clasificación de las epilepsias

El primer intento de clasificación de las epilepsias fue realizada por la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE del inglés International League Against Epilepsy) en 1981 (Tabla 1) y revisada posteriormente en 1989 por la ILAE (ILAE, 1981, 1989) (Tabla 2). La clasificación fue sometida a una revisión en el 2001 y se introdujo varias síndromes epilépticos y condiciones relacionadas que no fueron incluidas en las clasificación de 1989 (Engel, 2001).

A rasgos generales se puede decir que la clasificación llevada a cabo en 1981 se basó solamente en fenómenos descriptivos clínicos y EEG. Igualmente, en esta clasificación las crisis que sucedían en un hemisferio se definían como *crisis parcial*, mientras que crisis que iniciaban en ambos hemisferios se determinaban como *crisis generalizada* (Engel y Philip, 2006; ILAE, 1981). A su vez la clasificación dividía *crisis parciales* en *simple*; si no había alteración de la conciencia y *compleja* si la conciencia estaba comprometida. Por otro lado, en cuanto a las *crisis generalizadas* se dividían a menudo en tipo *convulsivo* y *no convulsivo*. En el tipo *convulsivo* se incluía crisis tónico-clónica generalizada las cuales previamente se habían llamado *gran mal*. Así como crisis que eran puramente clónicas, puramente tónicas y varias que combinaban las dos manifestaciones ictales. En las crisis generalizadas *no convulsivas* incluían crisis de ausencia anteriormente llamadas *pequeño mal*, así como atípicas crisis de

ausencia (Engel y Philip, 2006). Por su parte la clasificación realizada en 1989 supuso un gran avance desde el punto de vista clínico pues se basó en la diferenciación entre síndromes generalizados, síndromes focales o relacionados con una localización, síndromes indeterminados y síndromes especiales (Salas-Puig y Gil-Nagel, 2004). La clasificación distingue en cada uno de los grupos, los síndromes idiopáticos, criptogénicos y sintomáticos (ILAE, 1989). Actualmente se ha realizado una nueva revisión con las correspondientes modificaciones propias del conocimiento que se ha venido obteniendo gracias al desarrollo de nuevas técnicas y métodos de identificar las crisis, como la neuroimagen, la genética de las epilepsias, entre otros. Esta nueva revisión llevada por la acabo en ILAE, debaten sobre la terminología empleada en la actualidad y en las clasificación anteriores, aclarando conceptos empleados con anterioridad (Berg et al., 2010).

I Crisis parciales (focal, local)

A. Crisis parciales simples:

1. Con signos motores.
2. Con alucinaciones somatosensoriales o sensoriales especiales.
3. Con signos y síntomas autonómicos.
4. Con síntomas psíquicos.

B. Crisis parciales complejas:

1. De inicio como parcial simple seguida de alteración de la conciencia.
2. Con trastorno de conciencia desde el inicio.

C. Crisis parciales con generalización secundaria:

1. Crisis parciales simples que se generalizan.
2. Crisis parciales complejas que se generalizan.
3. Crisis parciales simples que evolucionan a complejas y se generalizan.

II Crisis generalizadas (convulsivas o no convulsivas)

A. Crisis de Ausencia:

1. Ausencia Típicas.
2. Ausencia Atípicas.

B. Crisis Mioclónicas.

C. Crisis Clónicas.

D. Crisis Tónicas.

E. Crisis Tónico-clónicas.

F. Crisis Atónicas.

III Crisis epilépticas no clasificables

Tabla 1 Clasificación de las epilepsias según ILAE, 1981 (Engel, 2001).

1. relacionados con una localización (parcial, focal)

1.1 epilepsias parciales idiopáticas (dependientes de la edad):

Epilepsia infantil benigna con puntas centrotemporales.

Epilepsia infantil benigna con paroxismos occipitales.

Epilepsia primaria de la lectura.

1.2. Epilepsias parciales sintomáticas:

Epilepsia del lóbulo temporal.

Epilepsia del lóbulo frontal.

Epilepsia del lóbulo parietal.

Epilepsia del lóbulo occipital.

1.3. Criptogénicas, definidas por:

Tipo de crisis.

Características clínicas.

Etiología.

Localización anatómica.

2. Epilepsias y síndromes epilépticos generalizados

2.1. Idiopáticas (primaria):

Convulsiones neonatales benignas familiares.

Convulsiones neonatales benignas.

Epilepsia mioclónica benigna del niño.

Epilepsia de ausencia de la niñez (picnolepsia).

Epilepsia de ausencias juvenil.

Epilepsia mioclónica juvenil (pequeño mal impulsivo).

Epilepsia con crisis de gran mal al despertar.

Epilepsias con crisis reflejas.

Otras epilepsias generalizadas idiopáticas.

2.2 epilepsias generalizadas criptogénicas o sintomáticas:

Síndrome de west.

Síndrome de lennox-gastaut-dravet.

Epilepsia con crisis mioclono-astáticas.

Epilepsia con ausencia mioclónicas.

2.3. Epilepsias generalizadas sintomáticas.

2.3.1 etiología inespecífica:

Encefalopatía mioclónica precoz.

Encefalopatía epiléptica infantil precoz con brotes de supresión.

Otras epilepsias generalizadas sintomáticas.

2.3.2 síndromes específicos:

Crisis epilépticas como complicación de otras enfermedades.

3. epilepsias y síndromes epilépticos imposible determinar

3.1. Epilepsias y síndromes epilépticos que son crisis generalizadas y crisis focales a la vez:

Crisis neonatales.

Epilepsia mioclónica severa de la infancia.

Epilepsia con puntas-ondas continuas durante el sueño lento.

Síndrome de landau-kleffner.

Otras epilepsias indeterminadas.

3.2. Epilepsias y síndromes epilépticos cuyas características no permiten clasificarlos como generalizados o focales

4. Síndromes especiales

4.1. Crisis en relación a una situación en especial:

Tabla 2 Clasificación internacional de las epilepsias, síndromes epilépticos, y crisis convulsivas relacionadas. ILAE, 1989 (Engel, 2001).

2 EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL (ELT)

La ILAE en su clasificación de 1981 define fenomenológicamente los términos crisis parcial simple y crisis parcial compleja. Sin embargo, fue en la clasificación de 1989 donde se dividió las epilepsias y los síndromes epilépticos sintomáticos localizados en función del lóbulo cerebral donde se originan y se reconoció un síndrome denominado “*epilepsia temporal*” (ILAE, 1989) (Tabla 2). La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) se encuentra dentro de las epilepsias más frecuentes de origen focal y su resistencia al tratamiento médico es de aproximadamente el 50% en los pacientes, de esta manera la ELT es la que con mayor frecuencia requiere un tratamiento quirúrgico (Rojo 2003; De Ilano, 2005). El síndrome epiléptico temporal incluye crisis originadas en estructuras mesio-basales (hipocampo, amígdala, corteza entorrinal). Las denominadas Epilepsia del Lóbulo Temporal Medial (ELTM) también pueden originarse en regiones del neocortex temporal denominadas Epilepsias del Lóbulo Temporal Lateral (ELTL), siendo estas últimas menos frecuentes (Kanner y Campos., 2004; De Ilano, 2005). Sin embargo, cabe señalar que de todas estas estructuras probablemente la más importante fisiopatológicamente es el hipocampo.

Desde el punto de vista neuropatológicos, el hallazgo más común asociados son la atrofia asociada con la pérdida de neuronas en el lóbulo temporal mesial siendo este hallazgo patológico el más frecuente en estas epilepsias. A su vez la combinación de pérdida neuronal de al menos 30% en el hipocampo y gliosis se denomina esclerosis temporal mesial (esclerosis hipocampal o esclerosis del cuerno de Ammón) correspondiendo al correlato anatómico que subyace en la ELT de origen mesial (Spencer, 2002).

Por otro lado, aunque la electroencefalografía (EEG) siempre ha sido considerada clásicamente la técnica empleada en la clínica y en la investigación en la epilepsia, en la actualidad gracias a la incorporación de técnicas de neuroimagen en investigación se ha avanzado a grandes pasos en su estudio. A continuación se realizara una descripción de las técnicas de neuroimagen empleadas en la presente tesis doctoral y su relación con el estudio de las epilepsias.

2.1 La electroencefalografía (EEG) y epilepsia

El electroencefalograma fue descubierto por Hans Berger, un psiquiatra alemán, en 1929 y desde entonces ha experimentado un gran desarrollo. El electroencefalograma es la técnica clásica para detectar y diagnosticar las epilepsias, básicamente es una exploración neurofisiológica que se basa en el registro de la actividad bioeléctrica cerebral en diferentes condiciones. El electroencefalograma es una mezcla de fluctuaciones (ondas) rítmicas y de forma sinusoidal y cuyo origen radica, principalmente, en las conexiones entre el tálamo y la corteza, que se producen de forma rítmica y continuada. Así mismo, la actividad eléctrica de las células piramidales de la corteza cerebral es la principal fuente de los potenciales del electroencefalograma. Las células piramidales proyectan sus axones a otras áreas cerebrales y a la médula. Además presentan axones colaterales que se proyectan localmente. Algunos pueden extenderse muchos milímetros en un plano paralelo a las capas de la corteza. Las conexiones hechas por los axones colaterales juegan un importante papel en la actividad eléctrica de las agrupaciones neuronales de la corteza cerebral. Así como de la aparición y propagación de la actividad epiléptica.

Experimentalmente se puede hacer trazados de la actividad cerebral con electrodos intracelulares que registran la actividad eléctrica de neuronas individuales o con electrodos extracelulares que detectan los potenciales de acción en neuronas próximas. El trazado extracelular puede detectar también la actividad sincronizada de grandes cantidades de células; estas señales reciben el nombre de *potenciales de campo*. Con la baja resolución temporal del trazado extracelular, los potenciales de campo aparecen como oscilaciones eléctricas fugaces denominadas puntas.

En humanos el EEG normal muestra actividad en el espectro de 1-30 Hz, con amplitudes de 20 μ V. El rango de frecuencias con interés fisiológico se divide básicamente en las siguientes bandas: delta δ (< 4Hz), theta θ (4-8Hz), alfa α (8-14Hz), beta β (14-30Hz) y gamma (>30Hz), con propiedades fisiológicas y patológicas propias. La crisis epiléptica se presenta en el EEG como una

alteración caracterizada por una breve y episódica descarga sincrónica neuronal con un incremento dramático de la amplitud. Así mismo, las ondas δ (0.5-4 Hz) como θ (4-7 Hz) son normales durante la somnolencia y la fase precoz del sueño (Westbrook., 2000).

2.1.1 Las descargas epilépticas intercríticas (DEI)

Las descargas epilépticas intercríticas (DEI) representan el correlato extracelular de las descargas excesivas y sincrónicas de un grupo de neuronas corticales, éstas poseen una respuesta eléctrica estereotipada que se caracteriza por cambios despolarizantes rápidos, intensos y duraderos del potencial de membrana (PDS). La magnitud despolarizante de este fenómeno es tal que el potencial de membrana puede variar de -85mV hasta $+30\text{mV}$ en una duración entre 50 y 200 ms. Cada PDS hace que se disparen ráfagas de potenciales de acción en su pico despolarizante siguiéndole un periodo de hiperpolarización. En los registros intracelulares de los focos epilépticos experimentales aparece un potencial abrupto de despolarización coincidente con el componente inicial de la espiga interictal. Este potencial de despolarización es generado por un potencial postsináptico excitatorio que es amplificado por una respuesta intrínseca de membrana voltaje-dependiente, que puede originarse por diferentes mecanismos, incluyendo la reducción de las sinapsis inhibitorias. Esta amplificación también puede deberse a la producción de potenciales de acción de regeneración dendrítico. Existen dos tipos de potenciales dendríticos: unos pequeños y rápidos y otros grandes y lentos. Los rápidos se bloquean por tetrodotoxina (bloqueante de los canales de Na^+), indicando que son espigas de Na^+ . En contraste los potenciales lentos son inhibidos por Mg^{2+} , el cual bloquea los canales de Ca^{2+} . En la epilepsia el balance normal entre excitación e inhibición está alterado, favoreciendo la excitación. Un potencial excitatorio postsináptico puede provocar la aparición de salvas de potenciales de acción dendríticos, especialmente espigas de Ca^{2+} , cuyas sumación producen una gran y prolongadas despolarización. En definitiva el origen de la respuesta eléctrica habría que buscarlo en las propiedades intrínsecas de la membrana de las células (canales de Na, K y Ca dependientes de voltaje) y las diferentes

entradas sinápticas excitatorias (glutamatérgicas) o inhibitorias (GABAérgicas) (Westbrook, 2000; Rojo, 2003).

El axón de las células piramidales tiene muchos blancos postsináptico. Una neurona que dispara un simple potencial de acción puede no activar la neurona postsináptica al no alcanzar su umbral de excitación, pero una salva de potenciales de acción, debido a la sumación temporal, es mucho más probable que produzca la excitación de la neurona postsináptica. Los cambios en el espacio extracelular juegan también un importante papel en la sincronización de la actividad neuronal. Así, la excitabilidad neuronal puede alterarse por la descarga de un grupo de neuronas, sumación de corrientes extracelulares. También ciertos cambios iónicos como la acumulación de iones K^+ en el espacio extracelular pueden incrementar la excitabilidad neuronal.

2.1.2 Patrón electroencefalográfico paroxístico ictal (PPI)

Durante el desarrollo de las crisis el EEG puede registrar diferentes alteraciones que muestran un repentino cambio de frecuencia (en gama, delta, theta o beta) que rápidamente, domina el trazado y que a veces son precedidas por un aumento o disminución de la DEI (Williamson et al., 1993). En el seno del foco epiléptico, las neuronas epilépticas se caracterizan no solo por su hiperexcitabilidad, si no también por su pronunciada tendencia a sincronizar aus descargas, sincronización que produce la formación de “puntas” en el trazado electroencefalografito. El patrón electroencefalográfico paroxístico ictal (PPI) puede ser local o difuso. El patrón típico, cuando el comienzo es focal, es un ritmo reclutante localizado o una atenuación de la actividad rítmica normal, lo cual, presumiblemente refleja una manifestación a distancia de un fenómeno electroencefalográfico. Este aumento o disminución de las frecuencias, presenta una lateralización, más o menos marcada de amplitud máxima durante las crisis y una lentificación postictal de las frecuencias del trazo EEG (Rojo, 2003). El comienzo ictal en el EEG consiste habitualmente, en descargas unilaterales rítmicas de 5-7 Hz que aparecen dentro de los primeros 30 segundos tras la primera anomalía ictal del EEG (Risinger et al., 1989). Las ondas agudas interictales y las crisis focales a menudo están limitadas en su propagación,

debido a que la despolarización es seguida por un periodo de hiperpolarización en el que la excitabilidad neuronal está disminuida. Un mecanismo importante de la hiperpolarización es la potente sinapsis inhibitoria de la corteza cerebral (Rojo., 2003). En la actualidad el uso del EEG acompañado de otras técnicas de neuroimagen vienen siendo de gran relevancia para el diagnostico de las epilepsias (Engel et al., 2006).

2.2 La Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones (PET, del inglés, positron emission tomography) es una técnica de imagen molecular *in vivo* capaz de medir la función fisiológica regional a partir del registro temporal de la evolución de fármacos trazadores marcados con un isótopo emisor de positrones. La aplicación de la PET con 2-deoxy-2-fluoro-D-glucosa marcada con un emisor de positrones, el ¹⁸F, que posee un semiperiodo de 110 minutos (2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa), permite evaluar el metabolismo celular proporcionando imágenes tomográficas cuantitativas de la distribución del consumo de glucosa.

La infraestructura necesaria para la aplicación de la técnica de PET está formada por tres unidades interrelacionadas: 1º) una unidad de producción de isótopos emisores de positrones de vida media corta, 2º) una unidad de radiofarmacia con un módulo de síntesis y control de calidad para la producción de FDG, y por último, 3º) una unidad de imagen médica, con una cámara PET con un sistema de anillos que detectan los fotones simultáneos emitidos en el proceso de aniquilación del positrón y un electrón. Tras la reconstrucción tomográfica de las imágenes, un médico nuclear interpreta las imágenes (Phelps; 2002; Gispert et al., 2002).

Para el estudio cuantitativo de neuroimágenes PET se requiere de una cuidadosa comprensión del proceso de formación de la imagen y de todas las fuentes de error que distorsionan la verdadera información fisiológica objeto de estudio. Podemos distinguir tres tipos de factores que limitan la calidad final de la imagen: las propiedades intrínsecas del trazador, los efectos exógenos y las limitaciones de la técnica. En cuanto a esta última hablamos de un término

importante, la “resolución espacial” (axial, radial y tangencial) que está influenciada por las especificaciones técnicas del sistema como el número, el tamaño y el material de los detectores y su disposición geométrica, por el rango del positrón, por la no colinealidad y por el proceso de reconstrucción de la imagen. También hablamos del denominado “efecto de volumen parcial” en el que están implicados la precisión de la medida, el tamaño y la localización de la zona de interés, la anatomía subyacente y la resolución del tomógrafo.

2.2.1 Ciclo de la FDG y metabolismo neurona-glía

La 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucosa es el radiofármaco PET más utilizado en la práctica clínica con aplicación en multitud de patologías gracias a sus características metabólicas, a la rapidez de su síntesis y a las posibilidades de transporte desde el lugar de su producción. Tanto la glucosa como la FDG entran en las células por medio de los transportadores de glucosa. Existen dos tipos fundamentales de estas familias de proteínas transportadoras, las SGLT Na^+ dependientes (principalmente en el intestino y en el tubo renal proximal) y las GLUT, Na^+ independientes. Las GLUT están presentes en casi todas las regiones pero tienen unas características diferenciadoras que posibilitan un mayor acumulo en algunos tipos celulares. Existen al menos once transportadores distintos caracterizados por ser proteínas con doce segmentos transmembrana que actúan mediante mecanismos de difusión facilitada (Peñuelas., 2002).

En el cerebro, tanto la glucosa como la FDG atraviesan la barrera hematoencefálica vía GLUT-1, pero su incorporación a las células nerviosas se produce por GLUT-3, transportador con una mayor afinidad por la glucosa que posibilita la incorporación de ésta a las neuronas incluso con niveles circulantes muy reducidos. Tras su entrada en la célula, tanto la glucosa como la FDG inician la vía glicolítica, con la fosforilación por la enzima hexoquinasa en el carbono seis. La desfosforilación del compuesto fosforilado es muy lenta, en comparación con el proceso directo, por lo que el efecto neto es la acumulación del precursor fosforilado, FDG-6-P. A continuación en la vía glicolítica se produce la isomerización por acción de la encima fosfoglucosa isomerasa para

formar fructosa-6- fosfato. La intervención del grupo hidroxilo del segundo carbono es fundamental para que pueda desencadenarse la isomerización; como la 2-FDG-6-P carece de dicho grupo funcional no se produce este paso y sufre atrapamiento metabólico al no poder ser metabolizado (a excepción del hígado). El resultado final del proceso es el acumulo progresivo del derivado fosforilado en el interior de la célula que será metabolizado lentamente (Heiss et al., 1984; Peñuelas., 2002).

No se conoce con exactitud el mecanismo molecular específico responsable del incremento del consumo cerebral regional de glucosa (rCMRGlu) en respuesta a activaciones fisiológicas de regiones cerebrales concretas, aunque se ha descrito un mecanismo de acoplamiento de actividad neuronal con la utilización de este metabolito (Pellerin et al., 1994). Algunos autores afirman que la imagen FDG-PET informa de la activación asociada del transportador de la glucosa y el metabolismo en los astrocitos más que de las neuronas (Barros et al., 2005).

2.2.2 Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y epilepsia

La tomografía de emisión de positrones con FDG comenzó a utilizarse para el diagnóstico de patologías cerebrales a finales de los años ochenta y rápidamente se aplicó en la evaluación prequirúrgica de las epilepsias intratables (Lavy et al., 1976; Kuhl et al., 1978; Ebersole, 1997; Barbara et al., 2002). En los primeros estudios clínicos se describe la aparición de cambios metabólicos cualitativos, principalmente una reducción, en las regiones correspondientes al foco epiléptico en estado intercrítico y un aumento considerable en situaciones de status epiléptico. Por su parte el uso del PET en investigación en pequeños animales se inicio a finales de los años noventa (Hume y Jones, 1998) y fue el estudio de Kornblum el primer trabajo publicado en el que se observa la actividad metabólica con FDG *in vivo* durante crisis convulsivas agudas (Kornblum et al., 2000).

En estudios dinámicos de FDG-PET interictales en pacientes con epilepsia en los que se determinan a partir modelos compartimentales la captación de FDG con análisis gráficos (Fig. 1), han mostrado que en la región epileptogénica los

valores de $K1^*$ y de $K3^*$ están reducidos en comparación a sus respectivos valores en la región homóloga contralateral y no se observan diferencias ipsilaterales versus contralaterales de ninguna constante en las áreas externas a la región epileptogénica (Cornford et al., 1998).

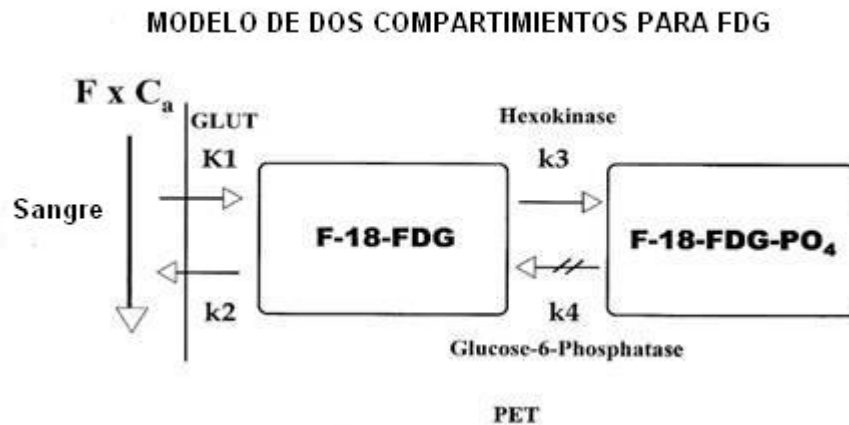


Figura 1. Esquema del metabolismo de la FDG según el modelo de dos compartimentos. El primer compartimento representa el paso de la FDG a la célula desde el torrente sanguíneo. El segundo compartimento representa la fosforilación de la FDG a FDG-6-P. K_1 que es una constante que refleja el flujo de FDG hacia el interior de la célula y K_2 la salida a sangre a través del transportador de glucosa. K_3 representa la fosforilación de la FDG y K_4 la desfosforilación, que en el caso de FDG no se da, por ello es siempre igual a 0 (Selberg et al., 2002; Castell y Cook, 2008).

La barrera hematoencefálica juega un importante rol en la regulación homeostática del microentorno necesario para la actividad estable y coordinada de las neuronas (Abbott, 2002). El flujo sanguíneo cerebral (CBF) normal en adultos es del orden de 50ml/100g/min y el consumo de glucosa del orden de 5.5mg/100g/min (entre 5.8-10.3 mg/100g/min para la sustancia gris y entre 3.6-5.2 mg/100g/min para la sustancia blanca). Bajo condiciones de reposo normales, el cerebro humano adulto utiliza el metabolismo oxidativo de la glucosa para suplir sus necesidades energéticas (aportando más del 95% de la energía necesaria). En estas condiciones, el cerebro presenta una fuerte correlación regional entre el CBF y la velocidad de metabolismo del oxígeno y de la glucosa -regiones con mayor flujo tienen mayor metabolismo y viceversa. El transporte de glucosa a través de la barrera hematoencefálica tiene lugar por un sistema mediado por transportadores saturable y específico. La cantidad de glucosa transportada desde la sangre al cerebro depende básicamente de dos factores, la concentración de capilares y la capacidad de transporte de la barrera

hematoencefálica (Shulman et al., 2004). Numerosas características normales de la barrera hematoencefálica aparecen alteradas en la epilepsia crónica. Estos cambios patológicos incluyen pérdida o alteración de la expresión del transportador GLUT-1 de la barrera hematoencefálica, el cual se ha encontrado sobre-regulado durante las crisis epilépticas, así como la elevación de la actividad del transportador, la que está caracterizada por un incremento de los transportadores GLUT-1, en particular en las membranas capilares (luminares) (Cornford et al., 1994). Otros cambios incluyen pérdida de la permeabilidad selectiva de varias proteínas y la alteración del transporte de una variedad de iones. Como resultado, está ampliamente aceptado que en la epilepsia crónica la barrera hematoencefálica está dañada. Lo que todavía no se ha demostrado es si las crisis contribuyen al fallo de la barrera o si la pérdida de la permeabilidad selectiva y la capacidad de transporte de glucosa de la barrera están implicadas en la epileptogénesis (Van-Vliet et al., 2007). Los experimentos muestran que el flujo cerebral y el metabolismo en la epilepsia focal deben estar desacoplados en regiones extensas pero esto no es debido ni a alteraciones estructurales ni a la duración o descarga ictal (Bruehl., 1998). Una rápida sobrerregulación de la barrera hematoencefálica ocurre dentro de los tres primeros minutos del inicio de una crisis (Cornford et al., 2000).

En los últimos años, con los avances en la adquisición y el análisis de las imágenes han surgido muchos estudios que identifican características metabólicas en grupos de pacientes epilépticos con algún rasgo en común como puede ser la localización del foco, la presencia de una lesión, hallazgos de esclerosis temporal mesial o los años de evolución de la enfermedad, en ellos se han descrito aspectos como la extensión del hipometabolismo, su graduación, el porcentaje de presencia de hipometabolismo o el porcentaje en el que el hipometabolismo puede identificar el foco. El hipometabolismo alrededor del foco es la principal característica del metabolismo de la glucosa en la fase intercrítica de la epilepsia. Por otro lado, el hipometabolismo temporal debe estar ya presente al comienzo de la epilepsia temporal, pero es menos frecuente y menos severo en los recién diagnosticados que en los pacientes crónicos (Gaillard., et al 2002). En algunos estudios se ha correlacionado la alteración metabólica con el número de crisis, sus hallazgos sugieren que una disfunción

inicial está presente en un número considerable de pacientes y que el metabolismo empeora por la actividad epiléptica continua (Matheja et al., 2001). El hipometabolismo temporal neocortical correlaciona con la atrofia del lóbulo temporal en la esclerosis del hipocampo asociada con displasia cortical microscópica (Diehl et al., 2003). En el trabajo de Cornford, realizando un protocolo dinámico de captación de 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucosa (FDG) con tomografía de emisión de positrones (PET) en ocho pacientes con epilepsia parcial compleja, obtiene que el foco epileptogénico en fase intercrítica es hipometabólico y es también una región en donde la barrera hematoencefálica presenta reducida actividad del transportador de glucosa. La epilepsia de larga evolución es asociada con mayor grado de hipometabolismo, sugiriendo que la epilepsia es una enfermedad progresiva (Theodore et al., 2004). Similar a lo visto en pacientes humanos con epilepsia del lóbulo temporal, estudios en animales que ha empleado modelos de SE como pilocarpina o ácido kaínico han generado un hipometabolismo en el cerebro de ratas tras un SE, este hipometabolismo es más pronunciado en estructuras tales como; el hipocampo, la corteza entorrinal y tálamo (Jupp et al., 2007; Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009).

Como se indicó anteriormente, la FDG es el radiofármaco que más se emplea. Sin embargo, en los últimos años con el surgimiento de los trazadores del receptor 5-HT_{1A}: 18F-WAY100635 y 18F-MPPF (Aznavour y Zimmer, 2007). Se ha podido estudiar la participación de la serotonina y su relación con la epilepsia. En estos pacientes se ha podido identificar que existe una disminución del receptor 5-HT_{1A} en el foco epileptógeno (Merlet et al., 2004_{ab}; Savic et al., 2004; Giovacchini et al., 2005; Ito et al., 2007; Lothe et al., 2008). Se discute cuál es el significado de este hallazgo. Merlet, relaciona esta disminución del receptor 5-HT_{1A} con el grado de epileptogenicidad, mientras que en los trabajos siguientes se sugiere que este hallazgo está relacionado con la susceptibilidad de los pacientes con TLE a la aparición de síntomas neuropsiquiátricos como la depresión o ansiedad. Por otro lado, la unión de [¹⁸F]-MPPF también ha sido monitoreado durante la estimulación eléctrica del Núcleo Dorsal del Rafe en ratas anestesiadas, esta estimulación presumiblemente imita el incremento fisiológico de liberación de serotonina. La estimulación del NDR a frecuencia de

(20 HZ durante 30 minutos) mostró un significativo incremento de niveles extracelulares de 5-HT en hipocampo, asociado con una reducción significativa (27-76 %) de la unión específica del [^{18}F]-MPPF en esta región (Rbah et al., 2003).

Finalmente, en la literatura se han señalado algunos modelos teóricos de acoplamiento entre la actividad eléctrica cerebral y el metabolismo (Aubert et al., 2002) por ejemplo, modelos de animales de epilepsia parcial han mostrado que las espigas interictales incrementan el metabolismo de la glucosa (Handforth et al., 1994). De esta manera el metabolismo cerebral de la glucosa a partir de la PET como la actividad eléctrica cerebral medida mediante EEG reflejan directa o indirectamente los mismos mecanismos de actividad neuronal (Ebersole et al., 2002; Aubert et al., 2002; Shulman et al., 2004).

2.3 Imagen de Resonancia Magnética (MRI) y epilepsia

Es una técnica no invasiva que utiliza el fenómeno de la resonancia magnética para obtener información sobre la estructura y composición del cuerpo a analizar. Se basa en la visualización de moléculas, usualmente protones dentro de un fuerte campo magnético (Nehlig y Obenaus, 2006). La Resonancia Magnética Nuclear RM presenta las siguientes ventajas: 1. visualización en los tres planos del espacio. 2. gran nitidez. La identificación inicial por RM de esclerosis del hipocampo fue una atrofia demostrada por imágenes coronales en T1 y aumento de la intensidad de la señal dentro del campo en T2 (Jackson et al., 1990). 3. capacidad de reconstrucciones tridimensionales, con fusión de imágenes. 4. posibilidad de obtener imágenes anatomo-funcionales mediante las técnicas de espectroscopía (Rojo, 2003). Los primeros estudios que emplearon la RM en epilepsia son de mediados de los años noventa (Berkovic et al., 1992; Williamson et al., 1993; Kuzniecky y Jackson, 1995).

La principal aplicación clínica de la RM en el caso de las epilepsias esta en identificar la base estructural de la epilepsia y determinar la presencia de una lesión o cambio que pueda ser la causante o estar vinculada con la epilepsia.

Los hallazgos más visibles con MRI son estudios en Esclerosis Temporal Mesial (Berkovic et al., 1992; Williamson et al., 1993; Kuzniecky y Jackson, 1995; Craven et al., 2011), malformaciones del desarrollo cortical, malformaciones vasculares, tumores y daño cortical adquirido (ILAE., 2003). El porcentaje de alteraciones estructurales varían según los estudios y varían también según la situación lobular del foco, pero aproximadamente en el 60-70% los hallazgos visuales de resonancias convencionales realizadas en pacientes diagnosticados de epilepsia del lóbulo temporal son compatibles con una falta de lesión o sin alteraciones específicas (Cascino et al., 1991). Igualmente, estudios en animales se ha observado mediante Resonancia Magnética estructural (RMe) pérdida neuronal y degeneración en capas CA1 y CA3 del hipocampo, la cual es acompañada de una fuerte activación microglial tras el *SE* con ácido kaínico y eléctrico (Wolf et al., 2002; Nairismägi et al., 2004; Jupp et al., 2006).

Así mismo, cuando la RM confirma hallazgos patológicos en el lóbulo temporal mesial, habitualmente incluye no sólo el hipocampo y la amígdala, sino también la corteza entorrinal y perirrinal. La muestra de atrofia se explica por una pérdida celular secundaria a la interrupción de las conexiones entorrinal-hipocampal como resultado de la interrupción eléctrica entre estas dos estructuras (Bernasconi et al., 2005).

La esclerosis del hipocampo esta caracterizada por un incremento en la señal T2 y en la señal FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery). La presencia de un incremento de la señal FLAIR se correlaciona con una mayor pérdida de células del hipocampo (Diehl et al., 2001). También se han encontrado valores anormales en el tiempo de relajación T2 en regiones remotas al foco epiléptico (Briellmann et al., 2004). Cambios en la forma de activación (incremento) o desactivación (disminución) de la señal BOLD (Blood-oxygen-level dependent) de la RM funcional (fMRI) ocurren simétricamente en la corteza de ambos hemisferios, tanto en regiones anteriores como posteriores, pero varían entre los pacientes. Cambios talámicos bilaterales también se han observado en el 80% de los pacientes, así como en modelos animales de epilepsias (Tenney et al., 2003;2004). Las activaciones predominan sobre las desactivaciones en el tálamo, mientras lo contrario ocurre en la corteza cerebral (Aghakhani., 2006).

2.4 Autorradiografía y epilepsia

La autorradiografía es un método derivado de las técnicas de fijación de radioligandos en el cual se emplean secciones histológicas en lugar de preparaciones de membranas y la detección de ligando se realiza mediante emulsiones fotográficas adecuadas. El principio de esta técnica consiste en la interacción de un ligando marcado radiactivamente con su lugar de unión o receptor. Es un método de tipo farmacológico con lo cual tiene que cumplir con una serie de criterios en cuanto a saturabilidad de la fijación, selectividad y afinidad del ligando por la molécula que se va a fijar (Yamamura et al., 1990; Romero, 1998).

Así mismo, la autorradiografía, permite la visualización de moléculas receptoras (receptores específicos, moléculas transportadoras para neurotransmisores, etc.) en secciones de tejido y tiene una gran resolución anatómica. El mayor inconveniente es su falta de resolución molecular, es decir, es imposible determinar con precisión en que células están presentes las moléculas marcadas radiactivamente. Sin embargo, con el tiempo se han venido solventando el problema al contar con marcadores específicos de determinadas neurotransmisores como el [^{18}F]-MPPF un radiotrazador específico del 5-HT_{1A} (Aznavour y Zimmer 2007). Los estudios señalan al MPPF como un antagonista competitivo del 5-HT_{1A} tanto en autoreceptores como en heteroreceptores *in vivo* (Thielen y Frazer., 1995; Thielen et al., 1996). El [^{18}F]-MPPF fue exitosamente trazado con flúor -18 para estudios PET (Shiue et al., 1997) y posteriormente optimizado por Le Bars (Le Bars et al., 1998). El primer estudio clínico con [^{18}F]-MPPF fue llevado a cabo en sujetos epilépticos (Merlet et al., 2004 a,b) basándose en la evidencia experimental de las propiedades anticonvulsivos y antiepilépticas del receptor de 5-HT_{1A} en roedores (Wada et al., 1997).

En experimentos realizados en cerebros de ratas, la distribución del [^{18}F]-MPPF en el tejido era caracterizado por una alta captación inicial en todo el cerebro seguida de un rápido declive de la radiactividad. Sin embargo, en regiones ricas en receptores de 5-HT_{1A} como el hipocampo el lavado del [^{18}F]-MPPF tomaba más tiempo en desaparecer comparado con estructuras como el estriado o

cerebelo (Plénevaux et al., 2000a). En un experimento llevado a cabo en pacientes epilépticos empleando el trazador [^{18}F] MPPF se observó una disminución de la fijación del ligando en la zona ictal epileptógena, concluyendo que esta se debía posiblemente a la pérdida neuronal debido a la crisis (Merlet et al., 2004). Por otro lado, estudios de PET *in vivo* en lo que se ha encontrado un hipometabolismo en varias estructuras cerebrales han sido confirmados empleando estudios de autorradiografía *ex vivo* con [^{14}C]2-deoxyglucose seguido de un SE inducido por pilocarpina (Dube et al., 2001; Andre et al., 2007). Finalmente, los estudios de autorradiografía se han empleado para demostrar alteraciones de neurotransmisores receptores de en tejido epiléptico humano. Se ha demostrado por ejemplo un incremento de lugar de unión de AMPA en tejido neocortical de pacientes que sufren epilepsia temporal (Zilles et al., 1999) igualmente se ha encontrado reducción de receptores de GABAérgicos acompañado de una aumento de receptores de NMDA (Crino et al., 2001).

3 MODELOS ANIMALES DE EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL

Entre las epilepsias más frecuentes y resistentes al tratamiento farmacológico se encuentra la ELT, sin embargo, ante la imposibilidad de estudiar la ELT en profundidad mediante la experimentación en pacientes humanos debido a obvias razones éticas y ante la necesidad de avanzar en el entendimiento de la fisiopatología que sucede en la ELT surgen la necesidad de emplear modelos animales de epilepsia (Martin y Pozo, 2006; Morimoto et al., 2004). Entre los modelos animales más empleados para el estudio de la ELT se encuentran los modelos de kindling tanto eléctricos como químicos, los cuales son considerarlos los más próximos a representar los aspectos fisiopatológicos que sucede en la ELT en pacientes humanos.

3.1 Kindling eléctrico

El modelo de kindling eléctrico es un modelo ampliamente empleado y aceptado como modelo de ELT crónico. Descrito inicialmente por Grahman Goddard en 1967 (Goddard, 1967), el kindling eléctrico refiere al desarrollo gradual de crisis

convulsivas comportamentales y electroencefalográficas en respuesta a la aplicación (generalmente en el hipocampo o amígdala) de estímulos eléctricos de baja intensidad (Racine, 1972, 1978). Estos estímulos son aplicados de manera repetida en el transcurso de varios días o meses y posteriormente conlleva a generar cambios permanentes en el lugar de la aplicación (McIntyre, et al., 2002) así como a las zonas cercanas, fenómeno denominado como *transferencia positiva* (Albensi et al, 2007). Este modelo tiene la ventaja de que tanto los estímulos como los cambios que se producen se pueden cuantificar (McIntyre, et al., 2002), otra ventaja del kindling eléctrico es contar con una escala de comportamiento, la llamada escala de Racine, que ayuda al investigador a monitorizar y mantener el control del desarrollo progresivo de las crisis en el transcurso del tiempo (Racine, 1972). La escala de Racine evalúa las crisis dando una puntuación de 0 a 5 (estadios de crisis). Donde los estadios 0-3 representan crisis focales (parciales), tras un tiempo en el estadio 3 la crisis tiende a propagarse (reclutar nuevas estructuras) y envuelve el hemisferio ipsilateral. Los estados 4 y 5 representan crisis convulsivas de diferente severidad. Tradicionalmente muchos investigadores consideran el desarrollo de crisis generalizadas, escala 4-5 como el punto final del kindling (Moshe, 1991). El kindling tiene la ventaja de no generar muerte neural a diferencia de otros modelos como los de *Estatus Epiléptico* (SE) (Tuunane y Pitknen, 2000; McIntyre, et al., 2002; Marimoto et al., 2004).

3.2 Kindling químico con pentilentetrazol (PTZ)

El kindling químico puede ser inducido por repetida administración en bajas dosis ya sea localizada (intracerebral) o sistémica de agentes farmacológicos que generan convulsiones (Moshe, 1991; Gilbert y Goodman, 2006). Por otro lado, tanto el kindling químico como el eléctrico parecen activar vías anatómicas similares (Gilbert y Goodman, 2006). Finalmente, muchos químicos (tóxicos así como agentes farmacéuticos) con una variedad de acciones primarias sobre la función del SNC pueden desencadenar convulsiones con exposición a altas dosis (Gilbert, 1992).

3.2.1 Generalidades del modelo de kindling con pentilentetrazol

El agente químico más usado para generar kindling químico es el pentilentetrazol (PTZ), el cual comúnmente se administra mediante la inyección de dosis subumbrales de PTZ hasta generar crisis convulsivas (Caín, 1981). Así mismo, el PTZ es un potente antagonista de GABA-A (Park et al., 2006) con propiedades de bloquear selectivamente los canales de cloruro acoplados al receptor de GABA-A (Gilbert y Goodman 2006). Ahora bien, aunque existen otras drogas que interfieren con la función GABAérgica y han sido efectivas para generar kindling químico en bajas dosis tales como el beta carboline (FG7142), picotroxina y bicuculina (Little et al., 1987; Luo et al., 2009; Godukhin et al., 2009). El kindling con PTZ se caracteriza por ser uno de los más reconocidos, así como por sus amplias ventajas cuando es comparado con otros modelos químicos de epilepsia. Por otro lado, una importante característica del PTZ es la facilidad con la que atraviesa la barrera hematoencefálica (Padou et al., 1995), y la latencia del inicio de la crisis, la cual es dependiente de la dosis suministrada, así como de la edad del animal (Marescaux et al., 1984; Snead, 1995; Weller y Mostofsky, 1995; Snead et al., 2000; Keogh et al., 2005; Zhao y Holmes, 2006; Velíšková, 2006). Para el caso de animales inmaduros, se ha visto que kindling con PTZ induce *status epilepticus* (SE) (Pereira de Vasconcelos, 1995; Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1996; Pineau et al, 1998; Erdogan et al., 2004; Nehlig et al., 2006). El SE es considerado una emergencia medica por el daño neuronal que este genera, así mismo es asociado a una alta morbilidad y mortalidad (Martín et al., 2005). Por otro lado, se ha demostrado que el daño neuronal (hipocampo, amígdala y corteza cerebral) en ratas inmaduras (PN10) 24 horas posterior al SE inducido con PTZ es solo transitorio y no resulta en ningún caso en muerte neuronal (Pineau et al, 1999).

3.2.2 Ventajas del kindling con pentilentetrazol

El kindling con PTZ ha demostrado ser un modelo robusto y altamente reproducible entre laboratorios y especies, además de tener ventajas en su valoración comportamental y EEG comparado con otros modelos de kindling químicos. La ventaja del modelo de PTZ radica en la facilidad de encontrar la

dosis-respuesta al umbral, de tal manera que una dosis puede llegar a ser identificable para detectar el umbral en casi todos los animales. Como resultado, un aumento gradual de las crisis es fácilmente inidentificable, y con suficientes repeticiones de PTZ la mayoría de los animales progresan a crisis tónico-clónicas (Gilbert y Goodman 2006).

3.2.3 Estructuras implicadas en el desarrollo del kindling con pentilentetrazol

Las crisis convulsivas generadas con pentilentetrazol (PTZ) tienen su origen en el prosencéfalo y se desarrollan dentro de los veinte minutos posteriores a la aplicación del PTZ (Gilbert y Goodman 2006; Velíšek, 2006). Estudios que han buscado trazar un mapa bioquímico de las estructuras implicadas en el modelo de kindling con PTZ han observado cambios sustanciales en los niveles de noradrenalina (NA), 5-hidroxitriptamina (5-HT), dopamina (DA) y metabolitos cerebrales en zonas conocidas por recluir nuevas estructuras cerebrales durante el kindling, como la corteza piriforme, entorrinal, prefrontal e hipocampo (*in vitro*) (Szyndler et al., 2010). Igualmente, se ha encontrado un aumento en la tasas de redistribución en el consumo de glucosa en la corteza y el hipocampo, así como en el mesencéfalo, tronco encefálico, hipotálamo y Septum en ratas que habían sufrido un SE inducido con PTZ (Pereira de Vasconcelos et al., 1992). Por otro lado, *c-fos* se ha empleado como marcador de la actividad neuronal y de distribución espacial en una variedad de paradigmas experimentales (Gilbert y Goodman, 2006), se ha visto expresión del *c-fos* durante el kindling eléctrico, que se ha relacionado con la propagación de la actividad neuronal durante las crisis (Clark et al., 1991). Así mismo, se ha observado incrementada expresión del mRNA *c-fos* en kindling con PTZ en corteza, caudado, septum, amígdala e hipocampo (Erdtmann-Vourliotis et al., 1998). Se ha visto igualmente que tras aplicar dosis subconvulsivas de PTZ en ratas adultas *c-fos* es expresado en tálamo e hipotálamo y en crisis clónicas, *c-fos* es expresado en striatum, tronco encefálico y hipocampo (Andre et al., 1998).

3.2.4 Valoración de comportamiento con pentilentetrazol

En el desarrollo del kindling los animales presentan cambios comportamentales que incluyen: inmovilidad, tirones mioclónicos (posición de canguro), ataques clónicos y ataques tónico-clónicos (Velíšek, 2006), posteriormente en la fase post-ictal se genera una inhibición que es observado con un EEG totalmente deprimido (plano). Para valorar el comportamiento observado en el kindling con PTZ se ha venido empleando de manera errónea en muchas investigaciones una escala de evaluación de crisis convulsivas similares a la empleada en el kindling eléctrico, olvidando las diferencias que existen entre crisis al emplear diferentes modelos. De esta manera tirones mioclónicos y convulsiones clónicas por ejemplo ocurren en kindling con PTZ, pero no en el kindling eléctrico. Teniendo en cuenta lo anterior se debería emplear una escala que haya sido desarrollado para kindling de PTZ teniendo en cuenta las diferencias tanto comportamental como EEG que distingue a los modelos (Luttjohann, et al. 2009; Ono et al., 1990).

3.2.5 Estudios de neuroimagen con pentilentetrazol

En los últimos años se han empezado a desarrollar estudios en pequeños animales empleando técnicas de neuroimagen tanto con Resonancia Magnética Nuclear funcional (RMNf) (Berkovic et al., 1992; Williamson et al., 1993; Kuzniecky y Jackson, 1995) como con Tomografía por Emisión de Positrones (PET) en epilepsia (Kornblum et al., 2000). El PET con el trazador ¹⁸FDG permite visualizar cambios metabólicos en todo el cerebro, así como los cambios metabólicos que se producen en un foco epiléptico, igualmente el estudio se puede repetir en el mismo animal lo que permite visualizar los cambios metabólicos y el desarrollo del foco epiléptico durante el proceso de epileptogénesis (Dedeurwaerdere et al., 2007; Jupp et al., 2007). Entre los trabajos realizados con PET hasta la fecha no hay ninguno que se haya utilizado el modelo de kindling con PTZ. Si bien los estudios PET han tenido mayor implementación en estudios clínicos humanos antes que en estudios experimentales en animales (Doherty et al., 2004; Scott et al., 2003), los pocos

estudios que han empleado PET y epilepsia se encuentran en modelos de *SE* con pilocarpina o ácido kaínico en donde se ha visto un hipometabolismo generalizado en el cerebro de ratas tras el *SE* (Jupp et al., 2006; Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009). Otros estudios con *SE* indican un aumento del metabolismo en hipocampo después de generar *SE* con la administración de pilocarpina en ratones C57Bl/6 (Mirrione et al., 2006), así como un aumento de la actividad metabólica tras la inyección de ácido kaínico en ratas (Kornblum et al., 2000).

En estudios con resonancia magnética nuclear funcional (RMNf) en modelos de kindling con PTZ se ha observado un rápido aumento de la señal segundos después de la administración de PTZ en el núcleo talámico anterior, giro dentado, corteza retrosplenial y otras estructuras hipocampales, así mismo, segundos antes del inicio de las crisis, y posteriormente se observó un rápido descenso de la actividad (Brevard et al., 2006; Keogh et al., 2005). Igualmente, se ha observado mediante Resonancia Magnética estructural (RMe) pérdida neuronal y degeneración en capas CA1 y CA3 del hipocampo, la cual es acompañada de una fuerte activación microglial tras el *SE* con ácido kaínico y eléctrico (Wolf et al., 2002; Nairismägi et al., 2004; Jupp et al., 2006). Por último, empleando autorradiografía la cual ha determina ubicación, así como fisiología de los diferentes receptores (Roberts et al., 1997; Aznavour y Zimmer, 2007), se ha descrito una disminución del receptor de 5-HT_{1A} en corteza temporal lateral ipsilateral al foco epiléptico en pacientes con TLE (Rocha et al., 2007).

4 FISIOPATOLOGÍA DE LA EPILEPSIA

En la actualidad, a pesar de contar con una amplio número de investigaciones tanto clínicas como experimentales en epilepsia, su etiología es en muchos casos desconocida, ante lo cual, los mecanismos básicos celulares y moleculares de la epileptogénesis están actualmente sujetos a la investigación. Cabe señalar que a pesar de lo anterior, la hipótesis que posee mayor consenso es que el mecanismo básico de la epileptogénesis radica en la pérdida del balance entre excitación / inhibición neuronal, necesaria para mantener el estado normal de las neuronas corticales (Jacobs et al., 2001), de esta manera las crisis

pueden sobrevenir si la transmisión excitadora cerebral esta aumentada o la transmisión inhibitoria es reducida (Bagdy et al., 2007). Esta pérdida del balance es muchas ocasiones consecuencia de una lesión neurológica (Dichter, 2006; Herman, 2006) y en otras es idiopática, es decir, sin causa conocida (6 de cada 10 casos). Se tiene claro es que la epileptogénesis es el proceso por el cual un cerebro normal se hace epiléptico (Gibbs y McNamara, 2006) y que debido a la epileptogénesis el cerebro experimenta una serie de cambios químicos, anatómicos, y fisiológicos que desencadenan continuas y frecuentes crisis convulsivas, las cuales se caracterizan por disparos sincronizados de algunas poblaciones neuronales del Sistema Nervioso Central (SNC) (Herman, 2006).

En la actualidad los dos neurotransmisores estudiados por excelencia en relación a la epilepsia son el GABA y el glutamato (Bradford, 1995), se ha sugerido que receptores de GABA y glutamato juegan un importante rol en el inicio, mantenimiento y finalización de las crisis convulsivas (Miller et al., 1997; Sierra-Paredes y Sierra-Marcuño, 2007; Kharlamov et al., 2011). Así como se ha señalado que el tratamiento farmacológico antiepiléptico, que tienen como dianas terapéuticas receptores GABAérgicos y glutamatérgicos es efectivo en más del 70%.

4.1 Participación del GABA en la epilepsia

Entre las hipótesis más consideradas en el estudio de las epilepsias se piensa en posibles fallos en el sistema inhibitorio como posible responsable del inicio de las crisis convulsivas (Bradford, 1995; Banach et al., 2011). Específicamente se apunta al papel crucial que tendría una alteración de la inhibición procedente de las interneuronas que secretan el neurotransmisor inhibitor ácido γ -aminobutírico (GABA) Estudios farmacológicos experimentales apoyan esta hipótesis, así, la administración exógena de agonistas glutamatérgicos o antagonistas GABAérgicos es capaz de inducir crisis epilépticas (André et al., 2001; Brooks-Kayal et al., 2009). Estos datos concuerdan con los obtenidos en modelos *in vitro* en hipocampo, en los que se ha podido comprobar que la hiperexcitabilidad del cerebro epiléptico es debida a una disminución en la vía inhibitoria GABAérgica o a un aumento en la actividad glutamatérgica (Gibbs y

McNamara, 2006). En modelos animales se ha comunicado una disminución del 60-70% de GABA extracelular en ratas con kindling amigdalario reportado mediante microdiálisis (Kaura et al., 1995).

4.2 Participación del glutamato en la epilepsia

Un desorden en la neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato ha sido por mucho tiempo candidato central como factor para la etiología de algunas formas de epilepsia humana y experimental. El glutamato reconoce al menos cuatro tipos de receptores, que reciben su denominación de acuerdo al tipo de agonista al que responde: receptores ionotrópicos; AMPA, NMDA (N-metil-D-Aspartato), Kainato (canales iónicos regulados por ligando) y los receptores metabotrópicos (Bloss y Hunter, 2010). De esta manera el glutamato en sí mismo y sus receptores agonistas genera convulsiones cuando es dado intracerebralmente (Bradford, 1995). Por su parte, el glutamato es el aminoácido excitador más rápido y de mayor prevalencia en el SNC. Realiza su acción excitadora actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal (Bloss y Hunter, 2010). La participación de glutamato en las crisis convulsivas se ha evaluado en estudios *in vivo* empleando microdiálisis en la amígdala. Durante el proceso de generación de kindling (epileptogénesis) así como durante las crisis inducidas eléctricamente en animales con kindling totalmente establecido, los niveles de glutamato son de 2-3 veces más altos que en animales control. Así mismo, en este mismo estudio, los niveles de GABA con microdiálisis en animales kindling se redujeron aproximadamente entre un 70% ipsilateral y un 60% contra lateral en la amígdala (Kaura et al., 1995). Un efecto similar fue encontrado en estudios *in vitro* en rodajas de amígdala de ratas kindling en donde se encontró un aumento de liberación 2 veces más alto que en rodajas de animales control (Kaura et al., 1995). De esta manera parece que existe una tendencia a un aumento de liberación de glutamato en la ocurrencia en el foco epiléptico durante el kindling (Bradford, 1995). También se ha demostrado que un kindling inducido por inyecciones de glutamato, puede ser prevenido con inyecciones simultáneas de AP7 un potente receptor antagonista de NMDA mostrando que la inyección de glutamato requiere interacción con los receptores locales de NMDA para la acción del kindling (Croucher y Bradford,

1990). Así mismo, se ha observado que kindling eléctrico puede llegar a ser bloqueado con inyección de receptores antagonistas de AP7 y CPP aplicado 15 minutos antes de la generación del estímulo eléctrico (Croucher et al., 1992; Sato et al., 1988).

5 SISTEMA SEROTONÉRGICO

El sistema serotoninérgico actúa como neurotransmisor y neuromodulador involucrado en múltiples funciones tanto fisiológicas como patológicas en el SNC. Fuera del SNC la 5-HT está involucrada en la contracción del músculo liso, movilidad gastrointestinal, mecanismos secretores periféricos e interacciona con neuronas sensoriales. A nivel circulatorio está implicada en la agregación plaquetar y puede actuar como vasodilatador o vasoconstrictor según la zona de circulación o el estado de la misma (Fozard, 1989). En el SNC, la 5-HT está involucrada en numerosas funciones fisiológicas como la regulación del dolor, regulación de la temperatura corporal, ingesta de comida y bebida, control del vómito, regulación neuroendocrina, actividad motora, control de la función cardiovascular, contracción muscular, regulación de la actividad sexual, ciclo sueño-vigilia y procesos de memoria y aprendizaje (Bradley et al., 1992). En cuanto a su participación en desórdenes psiquiátricos se ha relacionado con ansiedad y depresión (Coppen et al., 1963; Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998; Piñeyro y Blier, 1999), esquizofrenia, trastornos obsesivo-compulsivos, anorexia/bulimia (Woolley 1962; Coccaro et al., 1990) así como en el síndrome Down (Whitaker-Azmitia, 2001) y en la conducta agresiva (Carrillo et al., 2009) igualmente, está involucrada en la sintomatología de algunas enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson (Chinaglia et al., 1993), Alzheimer (Toghi et al., 1992; Steckler T., Sargal, 1995; Buhot et al., 2000; Porter et al., 2000) o Huntington (Cross, 1990). También está implicada en algunos trastornos neurológicos como la migraña (Lance, 1993). Así como en la epilepsia (Lu y Gean 1998; Wada et al. 1999; Bobula, et al. 2001; Theodore 2003; Chugani 2004) tema el cual nos concierne en la presente tesis doctoral y el cual será explicado con mayor detalle a continuación.

5.1 Las neuronas serotoninérgicas

La 5-HT es sintetizada a partir del triptófano, que es convertido a 5 hidroxitriptófano por la enzima triptófano hidroxilada, y este a su vez es convertido a 5-HT por la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Una vez formada la 5-HT, es almacenada en vesículas hasta que llega el momento de ser liberada. Cuando se libera al espacio sináptico es recaptado por el transportador serotoninérgico e inactivada por la Monoamino oxidasa (MAO) que la convierte en 5-acido-hidroxiindolacético. Por otro lado, la serotonina está presente en la mayoría de las especies animales y vegetales, localizándose en el caso de los mamíferos, en un 95 % en el sistema enterocromafín del tracto gastrointestinal, y el resto en las plaquetas y neuronas triptaminérgicas del sistema nervioso central y del Sistema Nervios Enterico (Gronstad et al., 1985; Gershon et al., 1965; Wade et al., 1994; Gershon, 2004).

Específicamente en los mamíferos, muchas neuronas serotoninérgicas residen dentro de las fronteras del núcleo del rafe (NR) como se ha mostrado con parámetros de citoarquitectura, así como se ha demostrado que según su tamaño y árbol dendrítico, las neuronas serotoninérgicas son diversas (Baker et al., 1990, 1991). Estudios de trazado anterógrado muestran que las neuronas 5-HT del Núcleo Dorsal del Rafe (NDR) y del núcleo Medial del Rafe (NMR) presentan terminaciones axónicas morfológicamente distintas en la corteza cerebral: los axones de las neuronas del NDR son finos (0.2-1.25 μm de diámetro), con varicosidades de pequeño diámetro (granulares o fusiformes), están ampliamente ramificados y presentan un elevado número de terminaciones (denominadas de tipo D); por el contrario, las fibras del NMR poseen axones de mayor diámetro (1.0-2.1 μm), contienen varicosidades esféricas voluminosas y presentan un menor número de terminales (tipo M) (Kosofsky y Molliver, 1987; Wilson y Molliver, 1991).

La proyecciones de las neuronas serotoninérgicas constituye uno de los sistemas anatómicos y funcionales más complejos y extensos del cerebro (Jacobs y Azmitia, 1992) y aunque la proporción de neuronas 5-HT respecto al resto de neuronas del SNC es muy baja (1/200,000), su capacidad de inervación de

estructuras anteriores, como la corteza cerebral o el hipocampo, es muy alta, estimándose de 3 a 6 millones el número de varicosidades por mm^3 (Audet *et al.*, 1989; Oleskevich y Descarries, 1990). Igualmente, dentro del NDR el cual contiene cerca de 11000 neuronas de serotonina en ratas (Descarries *et al.*, 1982), las neuronas están relativamente empaquetadas mientras que el NMR está menos organizado. Se conoce que las neuronas del NDR tienen una disposición relativamente más condensada, mientras que en el NMR se encuentran más pobremente organizada (Adell *et al.*, 2002). En cuanto a su estructura interna los tipos celulares del NDR presentan poca variación entre distintas especies, lo que sugiere una elevada conservación a lo largo de la evolución.

5.2 Receptores de 5-HT

Hasta la fecha, se han identificado hasta siete miembros dentro de la familia de los receptores de serotonina (5-HT₁ al 5-HT₇) y diversos subtipos incluidos en algunos de estos miembros. Ello ha conducido a la descripción y consideración un total de hasta 14 subtipos distintos (Hoyer y Martin, 1997; Lanfumey y Hamon, 2000). Inicialmente, los receptores se caracterizaban empleando herramientas farmacológicas, pero más recientemente, técnicas moleculares en biología han permitido la clonación y la secuenciación de estos receptores codificados por genes diferentes (Barnes y Sharp., 1999). El 5-HT pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (del 5-HT₁ al 5-HT₇) menos el receptor 5-HT₃ que actúa ligado a un canal iónico (Harrington *et al.*, 1988; Hensler, 2006). Ahora bien, aunque se conoce la existencia de catorce subtipos diferentes de receptores de serotonina (Hoyer y Martin, 1997; Lanfumey y Hamon, 2000) solamente el papel de 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₇ han sido estudiadas en relación con el control de las crisis epilépticas (Peričić, *et al.* 2005). Razón por la que se realizará una breve descripción de estos receptores y sus funciones en el SNC.

5.3 El receptor 5-HT₁

Desde la introducción de técnicas de fijación de radioligandos, seguido por la llegada de la clonación molecular, al menos 14 subtipos de receptores 5-HT se han identificado en el SNC de mamíferos. Por su parte, los receptores de 5-HT₁ comprende cinco subtipos: 5-HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{1E}, 5HT_{1F}. Estos receptores están acoplados a proteínas Gi/o que a su vez inhiben la enzima adenil ciclasa, disminuyendo así la producción de AMPc. Se sabe que el receptor de 5HT1 se encuentra en las regiones límbicas en especial en el hipocampo (Hoyer et al., 1997). El receptor de 5HT_{1A} fue el primer receptor que fue secuenciado o clonado en humanos (Fargin et al., 1988; Fujiwara et al., 1990) y posteriormente en ratas (Albert et al., 1990). La disponibilidad de agonistas como el 8-OH-DPAT (Arvidsson et al., 1981; Gozlan et al., 1983) así como el antagonista WAY-100635 (Laporte et al., 1994; Gozlan et al., 1995), hacen del receptor de 5-HT_{1A} uno de los mejores caracterizados en términos de rasgos estructurales, características, distribución en el cerebro y propiedades electrofisiológicas.

Este receptor es muy conservado entre especies de mamíferos; en la rata tiene un 89% de homología con el receptor humano y un 85 % entre rata y ratón (Albert et al., 1990). El gen del receptor subtipo 5-HT_{1A} se encuentra situado en la parte distal del cromosoma 13 del ratón y en el humano se encuentra sobre el cromosoma 5 (5q11.2-q13) y se compone de una proteína de 422 aminoácidos (Fargin et al., 1988; Lanfumey y Hamon, 2000) (Fig. 4). A nivel celular, estudios de hibridación *in situ* y inmunocitoquímicos demuestran la presencia de receptores 5-HT_{1A} en las neuronas piramidales y granulares del hipocampo (Pompeiano et al., 1992). Igualmente, estudios con autorradiografía y posteriormente con hibridación *in situ* han reportado alta densidad de sitios de unión de 5-HT_{1A} en áreas límbicas en especial en el hipocampo, septum lateral, zonas corticales (particularmente en corteza entorrinal y cingulada), también en el núcleo del rafe mesencefálico (tanto dorsal como media), en hipotálamo y en la medula espinal (Marcinkiewicz et al., 1984; Miquel et al., 1991; Pompeiano, 1992; Plénevaux et al., 2000, Aznavour et al., 2006_{a,b}). En contraste los niveles de unión del receptor de 5HT_{1A} en los ganglios basales y cerebelo apenas son

perceptibles. (Hoyer et al., 1994; 1997; Barnes y Sharp., 1999; Lanfumey y Hamon, 2000). En cuanto a su localización el receptor 5-HT_{1A} se encuentra presente en los cuerpos neuronales y posee dos localizaciones. Se expresa pre-sinápticamente en las dendritas y soma de las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe lo que le permite regular a nivel presináptico la liberación de serotonina cuando actúa como autoreceptor y post-sinápticamente ejerciendo una función primordialmente inhibitoria en las células que inerva. El receptor 5-HT_{1A} post-sináptico se expresa con una alta densidad en la región CA1 del hipocampo, septum, amígdala, núcleo del rafe y la corteza entorrinal (Albert et al., 1990; Hoyer y Martin., 1997). Se ha encontrado que la activación de los receptores de 5HT_{1A} causan hiperpolarización neuronal, cuyo efecto esta mediado a través de las proteínas G acopladas a canales de K⁺ (Andrade y Nicoll, 1987).

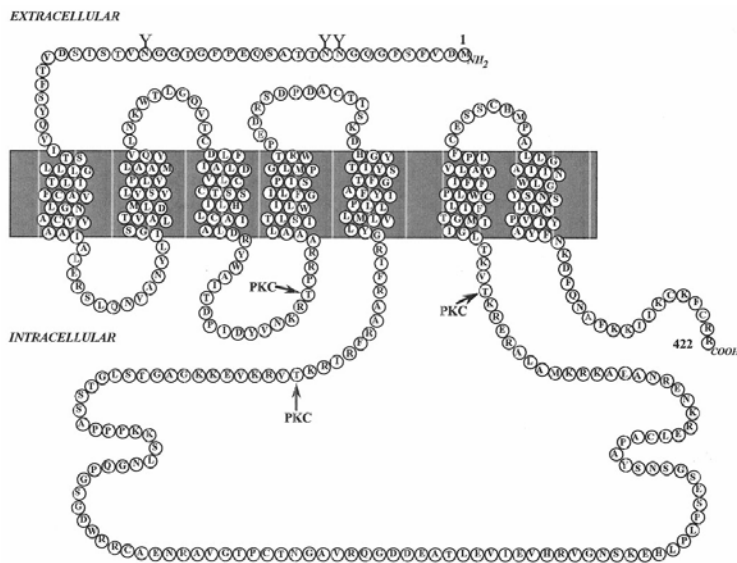


Figura 2. Organización molecular del receptor de 5-HT_{1A}. Tomado de Albert et al., 1990.

En cuanto a los receptores de 5HT_{1B}, estudios de autorradiografía han indicado que posiblemente son primariamente expresados presinápticamente y parecen actuar como autoreceptores terminales (Roberts et al., 1997) y encontrarse en muy altos niveles en las células de purkinje del cerebelo, en la región CA1 del hipocampo, y en el caudado-putamen y posiblemente están envueltos en el control del movimiento (Voigt et al., 1991; Maroteaux et al., 1992). Por otro lado, altos niveles de ARNm para el receptor subtipo 5-HT_{1D} fueron hallados en la capa piramidal del tubérculo olfativo. Así mismo, existe mucha confusión en

cuanto a la nomenclatura y farmacología del receptor subtipo 5-HT_{1D} y el 5-HT_{1B} debido a que los dos receptores están estrechamente relacionados, sin embargo sorpresivamente muestra dos desviaciones separadas en su forma y función. En humanos el 5-HT_{1D} y el 5-HT_{1B} difieren en un 23 % en su posición aminoácido transmembrana (Hartig, 1997). Así mismo el receptor 5-HT_{1D} parece ejercer como autoreceptor del NR (Piñeyro et al., 1996).

Por otro lado, en cuanto al receptor 5HT_{1E}, fue originalmente llamado como S31 y fue encontrado primariamente en la corteza y el estriatum pero es muy poco lo conocido sobre su rol fisiológico. Finalmente en relación al receptor subtipo 5HT_{1F} aunque se ha descrito la secuencia del ARNm y su localización y características farmacológicas, igual que el receptor subtipo 5HT_{1D}, no se han encontrado con exactitud evidencias que indiquen la función que realiza (Hoyer y Martin, 1997).

5.4 El receptor 5-HT₂

Hasta la fecha se han identificado 3 subtipos de receptores 5-HT₂: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. Está establecido que su activación produce un aumento en la hidrólisis de fosfoinosítidos y movilización de Ca²⁺ a través de la fosfolipasa C tras la activación inicial de una proteína Gq (De Chaffoy et al, 1985; Doyle et al., 1986). Los receptores 5-HT_{2A} se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza, pero también se localizan, aunque en menor grado, en el claustró, algunas áreas del sistema límbico, principalmente en el núcleo olfativo, y en zonas de los ganglios basales (Pazos et al., 1985). El 5-HT_{2A} se encuentra localizado en el cromosoma 13q14-q21 y tiene una secuencia relativamente alta de aminoácidos que se identifica con el receptor de 5-HT_{2C}, aunque esta es menor en comparación con el del receptor de 5-HT_{2B} de humanos. Estudios del receptor empleando autorradiografía con [3H]-spiperona, [3H]-ketanserina, [125I]-DOI y, más recientemente, [3H]-100907 MDL como radioligandos, han encontrado altos niveles para sitios de unión 5-HT_{2A} en las regiones del prosencéfalo, pero sobre todo en áreas cortical (neocorteza, la corteza entorrinal y piriforme, así como en el claustró), el núcleo caudado, el núcleo accumbens, tubérculo olfatorio y el hipocampo, de todas las especies estudiadas

(Pazos et al., 1985; López-Giménez et al., 1997). El interés actual por receptor de 5-HT_{2A} se centra en la evidencia de que la estimulación del receptor 5-HT_{2A} provoca la activación de una cascada bioquímica que conduce alteraciones en la expresión de una serie de genes que incluye los que codifican al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Vaidya et al., 1997). Además se ha visto la posibilidad de que cambios en estos sitios de conectividad sináptica en el cerebro puedan contribuir al efecto terapéutico de antidepresivos (Barnes y Sharp, 1999).

Por otro lado, el receptor 5-HT_{2B} media la contracción del estómago inducida por el 5-HT en la rata (Vane, 1959). Así mismo, el receptor 5-HT_{2B} (481 aminoácidos) es relativamente homólogo con el receptor humano 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}. En el humano el gen del receptor 5-HT_{2B} se encuentra localizado en la posición del cromosoma 2q36.3–2q37.1 Experimentos recientes que investigan la acción de los receptores 5-HT₂ con agonista BW 723C86 sugieren un papel para el receptor 5-HT_{2B} en la ansiedad (Barnes y Sharp, 1999). Sin embargo, extrañamente el BW 723C86 tiene un efecto ansiolítico, cuando se inyecta directamente en la amígdala medial (Duxon et al., 1997).

En cuanto al receptor 5-HT_{2C} fue identificado como un lugar de unión del [3H]-5-HT en el plexo coroideo de diversas especies que también podrían ser etiquetados por [3H]-mesulergine y [3H]-LSD, pero no por [3H]-ketanserina. Así mismo, originalmente este sitio de unión fue visto como un nuevo miembro de la familia del receptor 5-HT₁, y se calificó como 5-HT_{1C} por su alta afinidad por [3H]-5-HT (Pazos et al., 1984) pero, una vez que el receptor se clonó y se obtuvo más información sobre sus características se realizó un cambio a la familia del receptor 5-HT₂ y su reclasificación como receptor 5-HT_{2C} fue inevitable (Humphrey et al., 1993). Además de altos niveles detectados en el plexo coroideo, lugar de unión del 5-HT_{2C}, este receptor está ampliamente distribuido y presente en las áreas de la corteza (olfativas núcleo, piriforme, cíngulo y retrosplenial), sistema límbico (núcleo accumbens, hipocampo, amígdala) y los ganglios basales (núcleo caudado, sustancia negra). Aunque dos estudios han reportado el receptor 5-HT_{2C} en el Núcleo Medial del Rafe (Hoffman and Mezey, 1989; Molineaux et al., 1989; Palacios et al., 1991; Radja.,

1991) estos hallazgos no fueron confirmados en un sucesivo estudio (Mengod et al., 1990). En cuanto a la búsqueda de antagonistas para este subtipo se ha demostrado que los antagonistas SB 242084 y RS-102 221 son al menos dos veces más selectivos para el 5-HT_{2C} que para el 5-HT_{2B} y el 5-HT_{2A} (Bonhaus et al., 1997; Kennett et al., 1997). Finalmente, se ha sugerido que los receptores 5-HT_{2C} del plexo coroideo puede regular la formación de líquido cefalorraquídeo (LCR), como resultado de su capacidad para mediar en la formación de cGMP (Kaufman et al., 1995).

5.5 El receptor 5-HT₇

El receptor 5-HT₇ es el más nuevo de la familia de serotonina en ser identificado. Está acoplado positivamente a la adenilato ciclasa a través de proteínas Gs y tiene también baja homología con el resto de receptores 5-HT. Se han descrito 4 isoformas (5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7 (b)}, 5-HT_{7(c)}, 5-HT_{7 (d)}) pero en rata y humanos sólo se han encontrado que se expresen tres de las variantes. Su ARNm se expresa en el cerebro de rata, en concreto en el tálamo, hipotálamo, corteza, hipocampo y amígdala. Igualmente, no está clara su función fisiológica pero se ha relacionado con el comportamiento afectivo ya que responden farmacológicamente a algunos antidepresivos y antipsicóticos (Roth et al., 1994; Sleight et al., 1995).

En mamíferos se cree que el receptor 5-HT₇ tiene entre 445-448 aminoácidos de longitud (Nelson et al., 1995; Jasper et al., 1997) y que el gen del receptor 5-HT₇ se encuentra en el cromosoma diez del humano (10q21-q24; Gelernter et al., 1995). La expresión del receptor 5-HT₇ es relativamente alta dentro de las regiones del tálamo, el hipotálamo, el hipocampo con niveles generalmente más bajos en áreas tales como la corteza cerebral y la amígdala (To et al., 1995; Gustafson et al., 1996; Stowe y Barnes, 1998; Hagan et al., 2000). Se ha relacionado con los ritmos circadianos, sin embargo, es un tema de discusión (Edgar et al., 1993). Hasta hace muy poco, se conocía que el receptor 5-HT mediaba la respuesta de los ritmos circadianos y se consideraba en general que el receptor 5-HT_{1A} era el encargado de esta función, esto se basaba en gran medida en la capacidad de 8-OH-DPAT de imitar la respuesta de 5-HT (Cutrera

et al., 1996). Sin embargo, ahora se reconoce que el 8-OH-DPAT es también un agonista de los receptores 5-HT₇ (Bourson et al., 1997; Barnes y Sharp 1999; Vanhoenacker et al., 2000; Chapin y Andrade 2001; Peričić et al., 2005; Lopez-Meraz et al., 2005, 2007). Igualmente el 5-HT₇ se ha venido relacionando con una lenta post-hiperpolarización en neuronas CA3 piramidales del hipocampo (Beck y Bacon 1998_{a,b}). En la actualidad, estudios han puesto de relieve un paralelismo entre el receptor subtipo 5-HT_{1A} y 5-HT₇ (Le Corre et al., 1997).

Los dos receptores tienen similitudes farmacológicas incluida alta afinidad por el 5-HT, 5-carboxamidotryptamine (5-CT), y 8-OH-DPAT (Lovenberg et al. 1993; Peričić et al., 2005; Lopez-Meraz et al., 2007 Peričić y Strac, 2007). Así como una distribución superpuesta en el cerebro, incluido el hipocampo y estructuras corticolímbicas (Lovenberg et al. 1993; Gustafson et al. 1996; Le Corre, 1997; Harte et al., 2005).

5.6 Autoreceptores serotoninérgicos

Por otro lado, en el cerebro las neuronas serotoninérgicas ascendentes son negativamente controladas por autoreceptores de 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D} localizados en el soma y dendritas de neuronas en el NMR (Sotelo et al., 1990; Briley y Moret 1993). La importancia de los autoreceptores somatodendríticos de 5-HT_{1A} localizados en el NMR es el control de la neurotransmisión de 5-HT y ha sido confirmado con inyección local de 8-OH-DPAT un agonista de 5-HT_{1A} el cual genera una reducción en los niveles extracelular de 5-HT en la formación hipocampal de la rata (Sharp et al., 1989; Hillegaart et al., 1990).

5.7 5-HT en el Núcleo del Rafe Dorsal (NRD) y Medial (NMR)

La mayoría de las neuronas serotoninérgicas están localizadas a lo largo de la línea media del tronco encefálico, en el NDR y NMR. Las neuronas 5-HT presentes en el mesencéfalo se conocen desde Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1911) siendo además el primero en proveer un esquema de la estructura neuronal tanto del Núcleo del rafe dorsal (NDR) y medial (NMR). En 1960 Brodal y sus colegas observaron, como resultado de estudios de

degeneración y tinción no específico en gatos que el núcleo del rafe presentaba masivas conexiones con el prosencéfalo (Brodal et al., 1960_{a,b}).

5.8 Proyecciones serotoninérgicas al Núcleo del Rafe Dorsal y Medial

Se ha demostrado que un relativo pequeño número de cuerpos celulares neuronales localizados en el NDR y NMR dan origen a una densa red de varicosidades axonales las cuales impregnan por completo el prosencéfalo, incluyendo estructuras límbicas e hipocampo (Segal, 1975; Azmitia y Segal, 1978; Moore et al., 1978; Parent et al., 1981; Imai et al., 1986; Molliver, 1987; Tork, 1990; Jacobs y Azmitia, 1992; Hornung, 2003). A continuación se indicarán las aferencias y eferencias que el NDR y NMR origina a todo el cerebro con central interés en las proyección que se dirigen desde el rafe al hipocampo.

5.8.1 Aferencias del Núcleo del Rafe

La actividad de las neuronas serotoninérgicas está regulada por numerosas aferencias de distinta procedencia siendo de especial relevancia: la corteza prefrontal (CPF) y el *locus coeruleus* (LC). (Jacobs y Azmitia, 1992; Peyron et al., 1998; Adell et al., 2002).

- *Aferencias glutamatérgicas:* Las neuronas piramidales de la CPF proyectan a los núcleos aminérgicos del tronco del encéfalo y densamente a las neuronas serotoninérgicas tanto del NDR como del NMR (Aghajanian y Wang, 1977; Sesack et al., 1989; Takagishi y Chiba, 1991; Lee et al., 2003; Vertes, 2004). Sin embargo, el NDR también recibe aferencias de glutamato-aspartato de la habénula lateral (Stern et al., 1981; Kalén et al., 1989) que, de hecho, parecen ser las de mayor densidad de entre todas las aferencias que le llegan. Aunque la naturaleza de las aferencias de la habénula lateral es glutamatérgica (Kalén et al., 1985), se ha descrito que el carácter de dichas aferencias es inhibitorio, debido probablemente a la actuación del glutamato sobre neuronas GABAérgicas localizadas a nivel del NDR (Aghajanian y Wang, 1977; Stern et al., 1981; Kalén et al., 1989).

- *Aferencias noradrenérgicas*: Existe una fuerte interrelación anatómica y funcional entre los NR y el LC. Este último núcleo contiene la mayor parte de las neuronas noradrenérgicas (NA), que regulan tónicamente la actividad de las neuronas 5-HT a través de los receptores α 1-adrenérgicos (Aghajanian y Wang, 1977; Baraban y Aghajanian, 1981; Peyron et al., 1996).
- *Aferencias adrenérgicas*: procedentes del núcleo hipogloso, perihipogloso y del núcleo del tracto solitario (Aghajanian y Wang, 1977; Sakai et al., 1977).
- *Aferencias dopaminérgicas*: parece ejercer una importante influencia excitadora sobre el NDR (Ferré et al., 1994; Martín-Ruiz y Ugedo, 2001). Tanto la sustancia negra como el Área tegmental ventral (ATV) envían aferencias al NDR, así como grupos aislados de neuronas del núcleo dopaminérgico hipotalámico (Lee y Geyer, 1984; Peyron et al., 1995).
- *Aferencias GABAérgicas*: proceden del hipotálamo lateral, dorsal, posterior y ventromedial (área preóptica), del núcleo paragigantocelular (bulbo raquídeo), del núcleo central de la amígdala (Peyron et al., 1998) y de la sustancia gris periacueductal (Jolas y Aghajanian, 1997).
- *Aferencias acetilcolinérgicas e histaminérgicas*: las primeras procedentes del núcleo vestibular superior (Kalén et al., 1985) y las segundas del núcleo arcuato y del núcleo dorsomedial del hipotálamo.

5.8.2 Eferencias del Núcleo del Rafe

- *Ascendentes*: Los grupos serotoninérgicos de la protuberancia y el tronco encefálico (B5-B9) (Fig. 2) comprenden los núcleos de los rafe pontigo, dorsal y mediano, y se proyectan prácticamente a todo el prosencéfalo (Fuxe, 1965; Olsten y Seiger, 1972 Clifford, 2000). Las vías desempeñan importantes funciones reguladoras en el control cardiovascular y termorregulador del hipotálamo, y regulan la capacidad de respuesta de las neuronas corticales (Clifford, 2000). Se ha descrito que las proyecciones ascendentes están

divididas, en dos haces situados en posición dorsal y ventral y que el haz ventral: dividido a su vez en dos haces o tractos:

a) *Tracto del rafe dorsal.* Sus fibras invierten estructuras laterales del cerebro anterior: ganglios basales, núcleo accumbens y corteza piriforme.

b) *Tracto del rafe medial.* Inervan estructuras mediales del cerebro anterior: septum, hipocampo y corteza cingulada (Azmitia y Henriksen, 1976; Azmitia y Segal, 1978; Jacobs y Azmitia, 1992).

- *Descendientes:* Las neuronas del rafe de los grupos celulares B1-B3 situados a lo largo de la parte caudal del bulbo concretamente del núcleo del rafe oscuro, núcleo del rafe pálido y del núcleo del rafe magno (Fig.2) envían proyecciones descendentes a los sistemas motor y autónomo de la medula espinal. El núcleo magno del rafe (B4), situado a nivel de la parte rostral del bulbo, se proyecta al asta posterior de la medula, y se piensa que regula la percepción del dolor (Jacobs y Azmitia, 1992; Clifford, 2000).

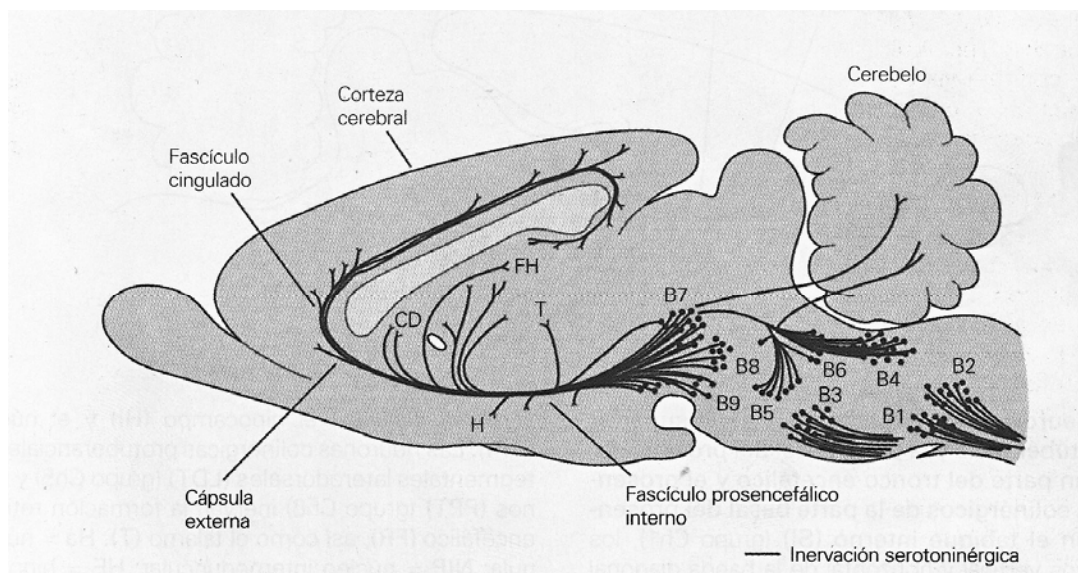


Figura 3. Neuronas serotoninérgicas a lo largo de la línea media del tronco encefálico. Las neuronas B4-9 que incluyen los núcleos de los rafe pontino, dorsal y mediano, y se proyectan a la parte superior del tronco encefálico, el hipotálamo, el tálamo y la corteza cerebral. CD= núcleo caudado; FH= formación del hipocampo; H= hipotálamo; T= tálamo. Tomado de Clifford, 2000.

5.9 5-HT en el hipocampo

Estudios de distribución de receptor de 5-HT_{1A} mediante autorradiografía en ratas, ha demostrado abundancia de receptores de 5-HT_{1A} en varios componentes del sistema límbico, tales como la corteza cingulada, corteza infralímbica e hipocampo, así como en Núcleo del Rafe (Marcinkiewicz et al., 1984). Igualmente, estudios que han combinado hibridación *in situ* y autorradiografía han revelado presencia de 5-HT_{1A} ARNm en estas mismas regiones anatómicas, tanto en las regiones de origen (NMR y NDR) como de proyección (hipocampo) (Miquel et al., 1991; Pompeiano et al., 1992).

5.10 Proyecciones serotoninérgicas al hipocampo

5.10.1 Aferencias al hipocampo

La formación hipocampal recibe dos principales clases de fibras aferentes:

El primero se origina en la corteza y se conoce que transmite información rápida y precisa a través de la formación hipocampal. Sistema de fibras de esta clase incluye la *vía Perforante*; procedente desde la corteza entorrinal establece conexiones excitadoras con las células granulosas de la circunvolución dentada. Las células granulosas son el origen de los axones que forman la *vía de las fibras musgosas*. *Vía de las fibras musgosas*; la cual conecta las células granulares del giro dentado a las piramidales de la región CA3 del hipocampo y la *vía Colateral de Schaffer*; la cual proyecta las células piramidales de la región CA3 a las células piramidales región CA1 (Segal, 1982; Kandel, 2000) (Fig.3).

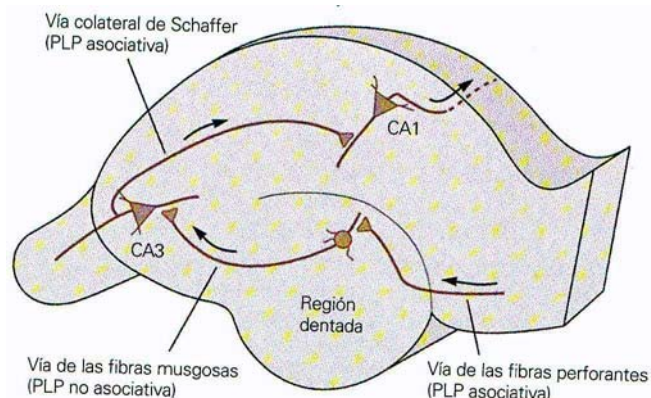


Figura 4. Las tres vías aferentes principales del hipocampo (las flechas denotan la dirección del flujo de impulsos). Tomado de Kandel, 2000.

La segunda clase de aferencias se origina en el núcleo subcortical y tiene patrones completamente diferentes de innervación, funciones fisiológicas y modos de acción. Estos incluyen el Núcleo del Rafe (NR), en particular el Núcleo del Rafe Medio (NMR), el *locus coeruleus* y el núcleo septal medial, todos los cuales son moduladores de la actividad hipocampal en respuesta a entradas corticales primarias. Este sistema afecta la actividad primaria hipocampal por sus acciones sobre la interneuronas inhibitorias (Freund et al., 1990; Halasy et al., 1992). Se ha reportado ampliamente que el Núcleo del Rafe Medio (NMR) inerva predominantemente la formación hipocampal dorsal y el núcleo septal medial, mientras que el Núcleo Dorsal del Rafe (NDR) inerva principalmente el hipocampo ventral (Azmitia y Segal, 1978; Molliver, 1987; Mokler et al., 1998, 1999).

5.10.2 Eferencias del hipocampo

Las vías eferentes del hipocampo consisten en las proyecciones corticales y subcorticales de las células piramidales del hipocampo (Reznikov, 1991). El hipocampo da lugar a una extensa serie de conexiones intracorticales. El área CA1 envía proyecciones unilateralmente al subiculum y da lugar también a proyecciones más limitadas al presubiculum, parasubiculum, corteza entorrinal, corteza cingulada, y corteza prelimbica prefrontal. Las áreas CA2 y CA3 envían proyecciones al subiculum, parasubiculum y área perirrinal. La única proyección subcortical de las células piramidales de las áreas CA1-3 es al núcleo septal lateral. Las fibras eferentes hipocampales alcanzan el fórnix a través de la fimbria, que es un haz de fibras que constituye el borde ventrolateral del hipocampo durante alguna distancia. Cada componente de la formación hipocampal (hipocampo, giro dentado y subiculum) tiene distinto patrón de conexiones eferentes y una representación específica en el fórnix.

5.11 Participación de la serotonina en la epilepsia

En la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para el control de la TLE se ha sugerido que el sistema serotoninérgico podría tener efecto en el control de las crisis epilépticas (Theodore, 2003; Mainardi et al., 2008). Se ha visto por ejemplo que algunos fármacos antiepilépticos como la carbamazepina, el valproato o la zonisamida pueden modificar la actividad serotoninérgica (Okada et al., 1999; Bagdy et al. 2007). Así mismo, se ha constatado un déficit serotoninérgico en modelos animales de epilepsia así como en pacientes epilépticos (Jobe et al., 1999).

Varias investigaciones han estudiado con anterioridad los cambios en la síntesis serotoninérgica mediante el empleo de agonistas y antagonistas (Rbah et al., 2003; Tohyama et al., 2001, 2002, 2007), así como se ha demostrado que estimulación eléctrica tanto del NDR como del NMR modifica las concentraciones serotoninérgicas (Mokler et al., 1998, 1999). Igualmente, estudios anteriores con estimulación eléctrica del NMR había sido explorado en el control de las crisis convulsivas empleado diferentes modelos experimentales de epilepsia, así como protocolos de estimulación con variados resultados (Kovacs & Zoll, 1974; Perryman et al., 1980; Nishi et al. 1980).

Por otro lado, se ha visto en el modelo de kindling con PTZ cambios en la actividad de las monomanías NA y 5-HT en estructuras límbicas asociadas con la reducción de las crisis (Szyndler et al., 2010). Así como se ha venido observando que la depleción de 5-HT cerebral conlleva a una reducción del umbral para la generación de convulsiones evocadas por estímulos audiogénicos, químicos y eléctricos (Bagdy, et al., 2007) y que por el contrario una acentuación serotoninérgica aumenta el umbral de la aparición de la descarga epileptiforme y reduce su duración de las crisis en modelos animales (Wada et al., 1993). Similarmente, el aumento de 5-HTP eleva significativamente el umbral para ataques generados por electro convulsiones y PTZ en rata y ratón pero extrañamente no tiene efecto anticonvulsivo en crisis en gerbos y ratas con kindling de amígdala (Löscher et al, 1985). Por otro lado, se han descrito efectos anticonvulsivantes de fluoxetina (inhibidor de la re-captación de 5-HT) en ratas

genéticamente propensas a epilepsia y en crisis generadas por estimulación eléctrica del hipocampo (Wada et al., 1999; Merrill et al., 2007) así como se ha observado un efecto anticonvulsivo del 5-HT_{1A} en crisis inducidas por picrotoxina (Lu y Gean 1998; Peričić et al 2005).

En estudios (*in vitro*) algunos autores han observado que la serotonina hiperpolariza las neuronas piramidales CA1 (Andrade y Nicoll, 1987) pero otros autores han observado el efecto contrario en neuronas piramidales de CA1 (Schmitz et al., 1995) y células granulares (Levkovitz y Segal, 1997) inhibiendo las interneuronas GABAérgicas a través del mismo receptor (Palchadhuri y Flügger, 2005).

De esta manera, en los últimos años se ha venido incrementado la evidencia que vincula la neurotransmisión serotoninérgica con la modulación de una gran variedad de modelos experimentales de crisis epilépticas inducidos tanto *in vivo* como *in vitro* (Bobula, et al. 2001, Lu and Gean 1998, Theodore 2003, Wada, et al. 1999). Sin embargo, algunos investigadores han indicado que los receptores serotoninérgicos modulan las crisis en función de la estructura inervada, así como del modelo epiléptico empleado (Lopez-Meraz, et al. 2005). Pese a todo lo anterior, la participación de la serotonina en la epilepsia del lóbulo temporal es aún controvertida, debido a que se han descrito efectos tanto convulsivantes como anticonvulsivantes atribuidos a este neurotransmisor. Ahora bien, actualmente de los catorce subtipos diferentes de receptores de serotonina, solamente el papel de 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₇ ha sido estudiados en relación con el control de las crisis epilépticas (Peričić, et al. 2005; Peričić y Strac, 2007).

5.12 Participación de receptores 5-HT_{1A}, 5HT_{2C} y 5HT₇ en la epilepsia

Se sabe que en el rafe la activación de los autoreceptores del 5-HT_{1A} produce una inhibición de las neuronas serotoninérgicas y reduce la liberación y neurotransmisión de 5-HT. En contraste, la activación del receptor 5-HT_{1A} postsináptico en el hipocampo incrementa la neurotransmisión de 5-HT (Clarke, 1996; Theodore 2003; Lanfumey y Hamon 2000). Este aumento y reducción en la trasmisión serotoninérgica se ha venido relacionando en los últimos años con la

modulación de las crisis epilépticas. Esta modulación se ha relacionado con la activación de receptores postsinápticos del 5-HT_{1A}, que abren canales de K⁺ (Andrade et al., 1986; Colino y Halliwell, 1987) acoplados a proteínas G, que inicia una hiperpolarización de la membrana e inhibición del disparo celular y reduciendo la población de espigas epilépticas (Lu and Gean 1998, Salgado y Alkadhi 1995; 1997, Theodore, 2003). En otras palabras, la activación de receptores de 5-HT_{1A} genera una hiperpolarización de la membrana plasmática y disminuye la excitabilidad neuronal (Chaput y de Montigny, 1988; Sprouse y Aghajanian, 1988).

En varios estudios se ha visto disminución del receptor 5-HT_{1A} en la región CA1 en el hipocampo tanto en el gerbo como en ratas propensas genéticamente a la epilepsia (GEPRs, del inglés *genetically epilepsy prone rats*) comparado con ratas control (Statnick, et al., 1996; Kim et al., 2007), así mismo, se ha hallado una reducción en la actividad epileptiforme mediante la activación del recetor 5HT-_{1A} en el hipocampo (Salgado-Commissariat y Alkanhi, 1997,). Ahora bien, estudios de pacientes con TLE con autorradiografía y PET han descrito una disminución del 5-HT_{1A} en corteza temporal lateral ipsilateral al foco epiléptico (Rocha et al., 2007; Merlet et al., 2004). Por otro lado, las investigaciones sobre la participación del 5-HT_{1A} en las epilepsias se ha realizado empleando agonistas no específicos como el 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) con variados resultados. Empleando 8-OH-DPAT se ha demostrado la disminución de las crisis tónicas y el índice de mortalidad inducido por pentilentetrazol (PTZ), así como se ha visto un efecto inhibitorio en la propagación del estado epiléptico (SE), aumento de latencia y reducción en la frecuencia de sacudidas de perro (WDS del inglés *Wet Dog Shakes*), ataques generalizados y aumento del umbral en crisis inducidas por ácido kaínico (Gariboldi et al., 1996; Lopez-Meraz, et al., 2005, 2007). También se ha visto retraso en la progresión del kindling hipocampal, y aumento el umbral de postdescarga (AD, del inglés *afterdischarge*) en ratas (Wada, et al. 1997).

En cuanto al WAY100635, un potente inhibidor del receptor subtipo 5-HT_{1A} (Cliffe et al., 1993; Laporte et al., 1994; Gozlan et al., 1995) tanto presináptico (autoreceptores) como postsináptico (heteroreceptores) que

atraviesa fácil y rápidamente la barrera hematoencefálica, modifica los efectos anticonvulsivos alcanzados con agonistas 8-OH-DPAT (Gariboldi et al., 1996; Watanabe et al., 2000; Lopez-Meraz, et al., 2005; Peričić, et al., 2005).

Por otro lado, los hallazgos en relación con el receptor 5-HT_{2C} son controvertidos y son materia de investigación. Se ha sugerido que los ratones mutantes que carecen de este subtipo de receptor son muy susceptibles a sufrir crisis audiogénicas y son propensos a muerte espontánea mediante convulsiones (Brennan et al, 1997; Applegate y Tecott 1998). Experimentos han demostrado que el agonista de 5-HT_{2C}, el m-CPP, causa una marcada disminución en el número de descargas en punta-onda (DSC) ya sea administrado por vía intraperitoneal o ventrículocerebral. El tratamiento previo con el antagonista de 5-HT_{2C} el SB-242084 elimina los efectos de m-CPP sobre DSC. Sin embargo, el SB-242084 por sí solo no consiguió causar ningún cambio significativo (Jakus et al, 2003). Los registros intracelular y extracelular muestran que la inhibición de descargas inducidas por 5-HT en el Núcleo Talámico Reticular (NTR) es mediada a través de receptores del 5-HT₂ así como el receptor subtipo 5-HT_{2C} (McCormick y Wang 1991).

Por último, en cuanto al receptor subtipo 5-HT₇, estudios con ratones knock out del receptor 5-HT₇ indican que el umbral de las crisis tanto en modelos eléctricos como químicos de epilepsia se reducen significativamente. Así mismo, se ha visto que las crisis inducidas con PTZ son más potentes (Witkin et al., 2007). En un estudio aparte se encontró que el efecto anticonvulsivo del agonista no específico 5-CT actúa a través de receptores 5-HT₇, ya que al administrar SB-269970 previamente se bloquea el efecto del 5-CT en un modelo de epilepsia con picrotoxina (Peričić y Strac, 2007). Se ha informado igualmente que SB-258719, un antagonista selectivo del 5-HT₇ significativamente disminuye el número de paroxismos y la duración de las descargas de punta-onda registradas electrofisiológicamente en un modelo de rata WAG/Rij de epilepsia de ausencia (Graf et al., 2004). Los datos anteriores implican el tálamo en la generación de las descargas de punta-onda (Steriade et al., 1993; McCormick, 2002). Así mismo, es conocido que los receptores de 5-HT₇ son especialmente abundantes en este núcleo (Bonaventure et al., 2002; 2004). Igualmente,

antagonistas no selectivos de 5-HT₇ han demostrado que protegen a ratones DBA 2J de intensas convulsiones inducidas por estimulación auditiva (Bourson et al 1997). Estos datos sugieren que antagonistas de 5-HT₇ pueden proteger contra las crisis audiogénicas y de un modelo de epilepsia de ausencia (Bourson et al 1997; Graf et al., 2004). Sin embargo, otros estudios empleando SB-258741 un antagonista de 5-HT₇ en modelos de crisis inducidas por electroshock y pentilentetrazol (PTZ) en ratones no demuestran ningún efecto benéfico de los antagonistas en crisis convulsivas en estos modelos de epilepsia (Christensen y Larsen, 1982; Nutt et al., 1986; Pouzet, 2002). Así mismo se ha encontrado que el antagonista SB-269970 carece de efecto en convulsiones inducidas por picrotoxina (Peričić y Strac, 2007). Se conoce actualmente que la similitudes farmacológicas entre los receptor 5-HT_{1A} y 5-HT₇, así, como su alta expresión en las estructuras corticolímbicas (Le Corre, 1997; Harte et al., 2005) Esta familiaridad hace difíciles de interpretar los datos debido al uso de ligandos que no discriminan receptores de 5-HT_{1A} del receptor 5-HT₇ (Bagdy et al., 2007) Esta dificultad hace que los estudios opten por utilizar ratones knock out carentes del receptor 5-HT₇ (Witkin et al. 2007).

II. OBJETIVOS

La hipótesis de partida de este trabajo es que el sistema serotoninérgico está implicado en el mantenimiento de la actividad neuronal epileptiforme que se genera en el hipocampo. Varios estudios en modelos animales tanto *in vitro* como *in vivo*, así como estudios clínicos, han descrito un efecto anticonvulsivo de la serotonina. Sin embargo, se desconoce el mecanismo y los receptores de serotonina implicados en la modulación de las crisis epilépticas. Dado que el Núcleo Medial de Rafe (NMR) es un importante centro de proyecciones serotoninérgicas a la formación hipocampal (Azmitia y Segal, 1978; Molliver, 1987; Mokler et al., 1998, 1999), es posible que su estimulación module las crisis epilépticas. De acuerdo con estas premisas, se estudiará el papel de la serotonina en la epileptogénesis.

La estimulación del NMR se evalúo en un kindling con PTZ, si como en un modelo de SE en animales jóvenes. Por otro lado, se determinó mediante el Micro-PET, los cambios metabólicos que suceden en el cerebro durante la inactivación del sistema GABAérgico durante el desarrollo de un kindling químico con PTZ y finalmente, se determinó mediante autorradiografía *in-vitro* y en *ex vivo* la fijación de radioligandos específicos de serotonina ¹⁸-MPPF y ¹⁸FDG en las diferentes áreas que pueden estar envueltas en la modulación de las crisis con pentilentetrazol (PTZ). De acuerdo a estas premisas, el proyecto que se propone nos permitiría dilucidar el papel de la serotonina en la epileptogénesis.

1. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar el papel de la vía serotoninérgica rafe-hipocampal en la regulación de la actividad epileptiforme en un modelo de kindling químico y *status epilepticus* *in vivo* y determinar los receptores serotoninérgicos involucrados en esta modulación.

Caracterizar mediante la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) los cambios metabólicos que suceden en el sistema nervioso central en un modelo de epilepsia *in vivo* por bloqueo de las interneuronas GABAérgicas mediante la administración de pentilentetrazol (PTZ).

Determinar los cambios moleculares que suceden en el cerebro de ratas que había sido expuestas a antagonistas del receptor GABAA pentilentetrazol (PTZ) mediante el empleo de ligando específicos de serotonina el ^{18}F -MPPF *in vivo* y *in vitro*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar y caracterizar electroencefalográficamente un modelo de epilepsia *in vivo* inducido por la administración de pentilentetrazol (PTZ), un antagonista del receptor GABA_A.

Estudiar el papel de las vías serotoninérgicas rafe-hipocampales en la regulación de la actividad epileptiforme inducidas por PTZ mediante la estimulación del Núcleo Medial del Rafe.

Investigar si es posible controlar el *Status Epilepticus* mediante la estimulación del NMR.

Determinar la participación de los receptores de serotonina tipo 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₇ en las crisis convulsivas inducidas por PTZ.

Caracterizar mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET) los cambios metabólicos que suceden en el sistema nervioso central en un modelo de epilepsia *in vivo* inducido por PTZ.

Determinar las estructuras de mayor captación de glucosa con ^{18}F -FDG y fijación a ligandos específicos de serotonina con ^{18}F -MPPF mediante el empleo de la autorradiografía *in vitro* y *ex vivo*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

- 1. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS
MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL
RAFE (NMR) EN UN MODELO DE KINDLING QUÍMICO**

1.1 Sujetos y grupos experimentales

Se emplearon ratas macho (Sprague-Dawley) con un peso de 300 ± 30 g (Harlan Interfauna, España) mantenidas en parejas a una temperatura constante (22°) y en una sala con ciclo de 12 horas de luz, con libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (86/609/EEC) para el uso de animales de experimentación, procurando minimizar el sufrimiento y el número de animales utilizados.

En los estudios sistémicos se emplearon 68 animales los cuales fueron divididos en ocho grupos experimentales de la siguiente manera, **(a)** grupo de control experimental en los que se administró PTZ ($n=8$); **(b)** animales tratados con PTZ y estimulados en el NMR una vez los espasmos se iniciaban (estado 2) ($n=12$); **(c)** animales tratados con WAY100635 (1 mg/kg, s.c., 40 min.) antes de la inyección de PTZ y estimulados una vez que los espasmos se iniciaban (estado 2) ($n=8$); **(d)** animales tratados con WAY100635 (1 mg/kg, s.c., 40 min.) antes de inyección de PTZ ($n=8$); **(e)** animales tratados con SB-269970 (10 mg/kg, i.p, 40 min.) antes de la inyección de PTZ y estimulados una vez iniciados los espasmos (estado 2) ($n=8$); **(f)** animales tratados con antagonista SB-269970 (10 mg/kg, i.p, 40 min.) antes de la inyección de PTZ ($n=8$); **(g)** animales tratados con SB-242084 (0.2 mg/kg, i.p, 30 min) antes de la inyección de PTZ y estimulados una vez que los espasmos se iniciaban (estado 2) ($n=8$); **(h)** animales tratados con antagonista SB-242084 0.2 mg/kg, i.p, 30 min antes de la inyección de PTZ ($n=6$).

Por otro lado, en los estudios de microperfusión intracerebral no se estimuló el NMR y se emplearon 12 animales, los cuales fueron divididos en cuatro grupos experimentales: **(a)** grupo control experimental con FCE ($n=4$); **(b)** animales tratados con FCE +WAY100635+PTZ (100 μ M), ($n=4$) **(c)** animales tratados con FCE +SB-269970+PTZ (1 mM), ($n=4$).

Tras los experimentos los animales fueron anestesiados profundamente con isoflurano y decapitados con una guillotina. El cerebro se extrajo rápidamente y luego congelado mediante inmersión en isopentano en hielo seco para la

verificación posterior, mediante cortes histológicos, de la posición de los electrodos y cánulas de microperfusión.

1.2 Fármacos

Los fármacos empleados en los estudios sistémicos y con microperfusión se detallan en la tabla 3. Para el caso de la microperfusión intracerebral *in vivo* se preparó diariamente fluido cerebroespinal artificial (FCE) con la siguiente composición: NaCl 147 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂ 1 mM, Hepes 10 mM. Todos los fármacos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, (Sigma-Aldrich Química, S.A. Barcelona, España), excepto isoflurano (Esteve, Barcelona, España). La dosis y tiempo de administración de WAY100635, SB242084 y SB269970 se determinó en base a estudios previos que indican que estas drogas son antagonista de 5-HT_{1A}, (Forster et al., 1995; Romero, et al., 1996; Artigas y Romero., 1996; Watanabe et al., 2000) 5-HT_{2C} (Jakus et al, 2003) and 5-HT₇ (Monti y Jantos 2006; Peričić y Švob 2007) respectivamente. Para su administración intraperitoneal, los fármacos fueron disueltas en salino estéril (NaCl 0.9%) y preparados inmediatamente antes de ser utilizados.

Farmacología	Abreviatura	Farmacología
N-[2-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-2-pyridinylcyclohexanecarboxamide maleate	WAY100635	Antagonista 5-HT _{1A}
6-Chloro-2,3-dihydro-5-methyl-N-[6-[(2-methyl-3-pyridinyl)oxy]-3-pyridinyl]-1H-indole-1-carboxamide dihydrochloride hydrate, 6-Chloro-5-methyl-1-[[2-(2-methylpyrid-3-yloxy)pyrid-5-yl]carbonyl] indoline dihydrochloride hydrate	SB 242084	Antagonista 5-HT _{2C}
SB 269970A, (R)-3-[2-[2-(4-Methylpiperidin-1-yl)ethyl]pyrrolidine-1-sulfonyl]phenol hydrochloride	SB 269970	Antagonista 5-HT ₇
A-Cyclopentamethylenetetrazole, 1,5-Pentamethylenetetrazole, 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-tetrazolo[1,5-a] azepine, Metrazole	PTZ	Antagonista GABA-A
1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter	Isoflurano	Anestésico inhalatorio

Tabla 3. Fármacos empleados en los experimentos.

1.3 Kindling químico y su valoración comportamental

La generación de crisis epilépticas en los estudios sistémicos y con microperfusión se realizó mediante un kindling químico con pentilentetrazol (PTZ), un antagonista de receptores GABA_A, (Caín, 1981; Ono et al., 1990; Erdogan et al., 2004; Pineau et al., 1999). El kindling químico se llevó a cabo suministrando dosis subconvulsivas de PTZ bajo el siguiente protocolo; una dosis de 40 mg/kg i.p., seguido 10 minutos luego de una nueva dosis de 20 mg/kg y diez minutos después una dosis 10 mg/kg (i.p). Disuelto en NaCl 0.9 % hasta que el animal alcanzaba el nivel 4-5 de la escala del comportamiento, diseñada para valorar crisis inducidas experimentalmente por PTZ. (Revisar y ponerlo mas claro). En caso de no observarse crisis, se aplicaba una dosis suplementaria de PTZ (10 mg/kg) hasta alcanzar un máximo acumulado de PTZ de 90 mg/kg. La evaluación comportamental se realizó teniendo en cuenta la escala comportamental empleada por Lamberty (Lamberty y Klitgaard, 2000). El empleo de esta escala obedece a que evalúa correctamente todos los fenómenos comportamentales que suceden durante las crisis inducidas por un kindling con PTZ (Lamberty y Klitgaard 2000; Velíšková 2006) y que otras escalas, como la de Racine, no contempla (McIntyre et al., 2002; Luttjohann et al., 2009), entre los cuales se encuentra la posición de canguro (Ono, 1990). Los parámetros comportamentales valorados fueron:

0. Inmovilidad.
1. Asentimiento con la cabeza y estereotipos faciales.
2. Ondas convulsivas a través del cuerpo (espasmos).
3. Sacudidas mioclónicas en las extremidades anteriores (postura de canguro).
4. Convulsiones clónicas en todas las extremidades, caída sobre el costado.
5. Convulsiones tónico-clónicas en todas las extremidades, caída sobre la espalda.

1.4 Implantación de electrodos en los estudios sistémicos

Todos los experimentos se realizaron en el laboratorio de electrofisiología animal de la unidad de cartografía cerebral del Instituto Pluridisciplinar (figura 5A). En los estudios sistémicos los animales fueron anestesiados Fluido Cerebro Espinal

Mecanismo de control de las crisis temporales en un modelo de kindling químico

(FCE) con isoflurano (5 % para la inducción y 2 % para el mantenimiento) y colocados en un dispositivo esterotáxico (Stereotaxic Stoelting, Psymtec, Madrid - España). Las constantes vitales (electrocardiograma, ECG, temperatura, frecuencia cardíaca y respiración) del animal fueron monitorizadas permanentemente con un sistema de Monitorización de pequeños animales (MR-Compatible, Model 1025, Psymtec, Madrid – España; figura 5B).

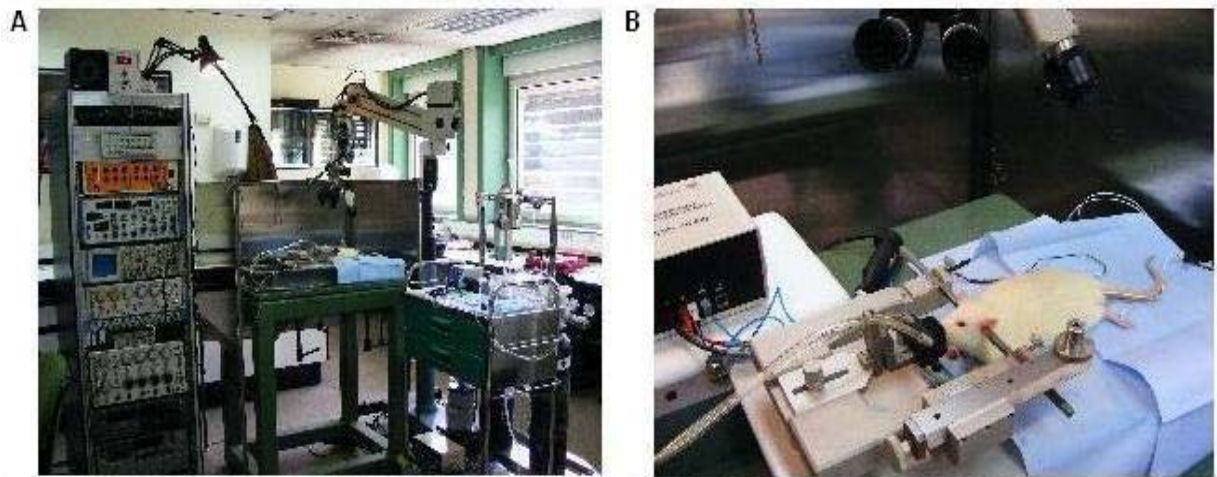


Figura 5. Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR. **A.** Set-Up de electrofisiología de la Unidad de Cartografía. **B** Animal bajo anestesia inhalatoria isoflurano y monitorizado.

Luego de tener el animal anestesiado y sujeto al equipo esterotáxico se procedió a exponer el cráneo del animal y localizar el bregma (figura 6A), a continuación se fijaron dos tornillos (0-80 Screw-Holding PlasticOne) al hueso frontal y parietal del cráneo como soporte de los electrodos (figura 6B).

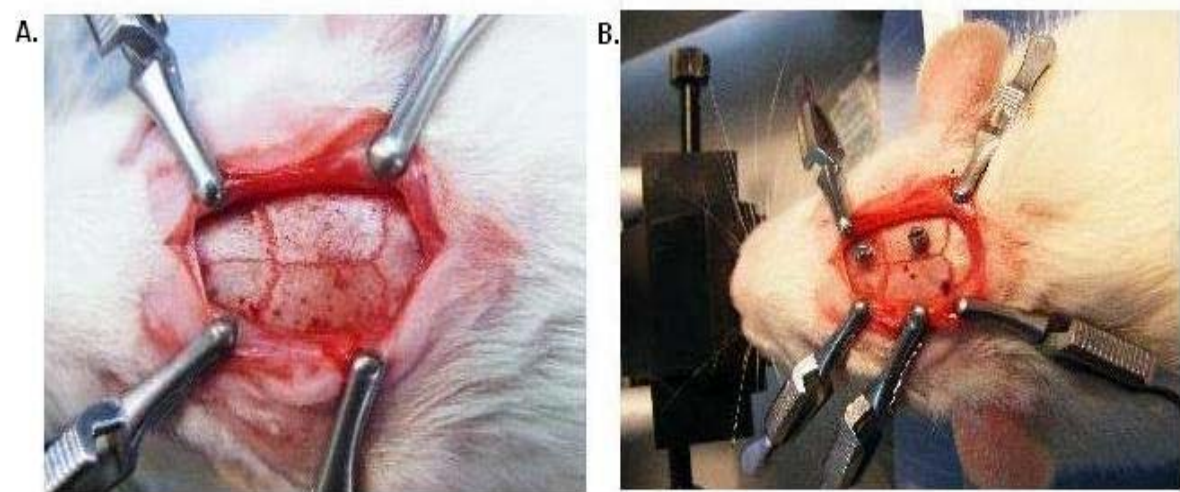


Figura 6. Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR. **A.** Ubicación del Bregma y coordenadas esterotáxicas. **B.** Fijación de tornillos al cráneo.

Teniendo el Bregma como referencia se implantaron electrodos de estimulación y registro de acero inoxidable, de acuerdo con las coordenadas del atlas esterotáxico (Paxinos y Watson, 1986). Para el registro se implantó un electrodo monopolar (MS333/1-A - Plastic One, Bilaney Consultants; Dusseldorf, Alemania) en la región de CA1 del hipocampo (AP:-3,6; ML:+2,0; DV:-2,6), un electrodo de tierra en la corteza prefrontal y un electrodo de referencia en el parietal (figura 7A). Para la estimulación se implantó un electrodo bipolar (MS333/1-B - Plastic One) en Núcleo Medial del Rafe (NMR) (AP -7.80, L +3.1, DV -9.2) en un ángulo de 20° para evitar bloquear el acueducto cerebral y prevenir el daño de la arteria cerebral media (Mokler et al., 1998, 1999) (figura 7B).

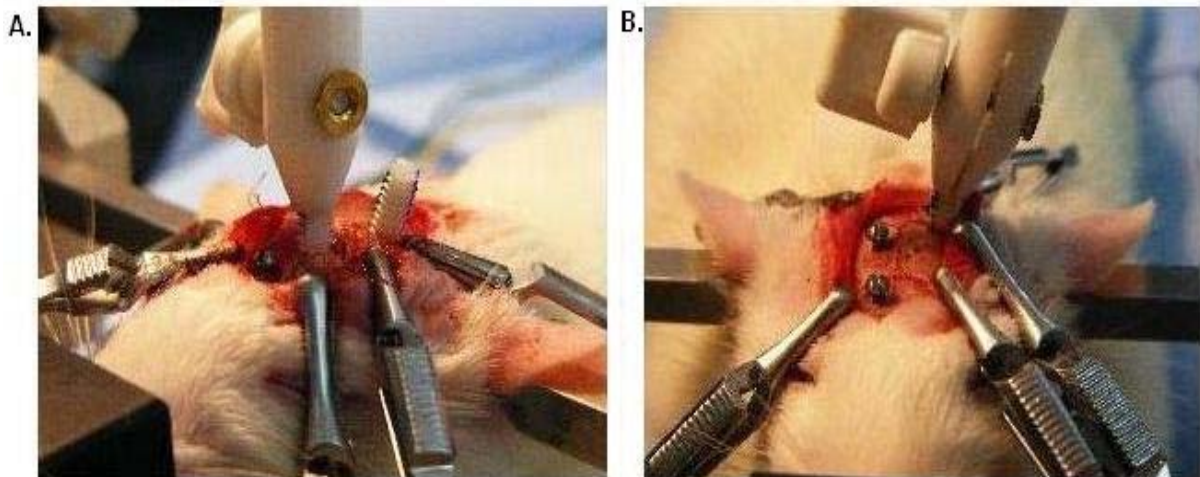


Figura 7. Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR. **A.** Implantación del electrodo monopolar de registro en CA1 hipocampal. **B.** Implantación del electrodo de registro en NMR en ángulo de 20°.

Finalmente, los electrodos se fijaron con cemento dental al cráneo (figura 8A). Los experimentos se realizaron tras 8 días de recuperación de los animales, tiempo durante el cual se efectuaron los cuidados postoperatorios y mantenimiento del animal. Todos los experimentos se realizaron con el animal despierto, libre y conciente en una caja de metacrilato diseñada en la Unidad de Cartografía Cerebral. Para evaluar el comportamiento del animal se realizó el registro por video cámara de su actividad durante los experimentos (figura 8B).

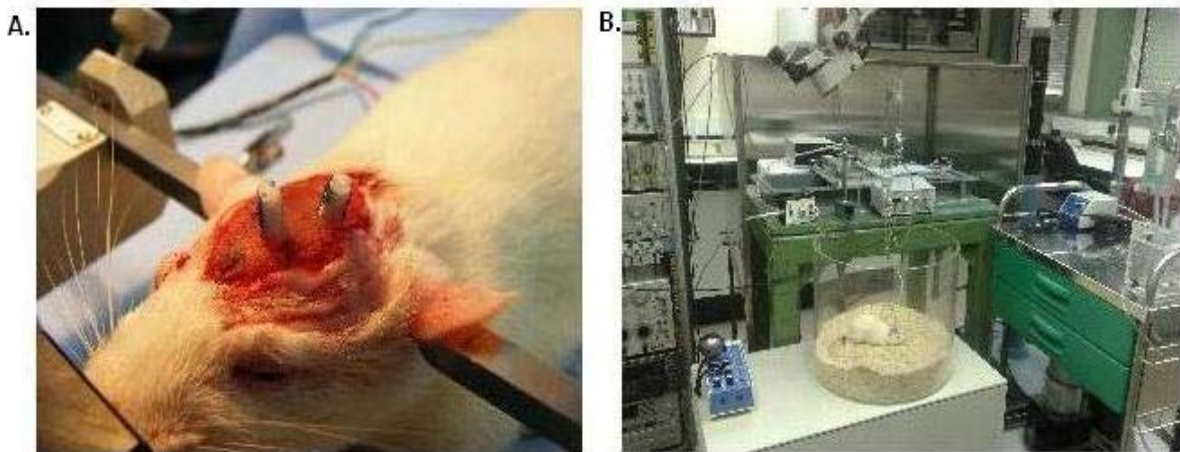


Figura 8. Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos en el NMR **A.** Electrodos implantados y fijados con cemento dental. **B.** Set-Up de registro *in vivo* 8 días luego de la cirugía.

1.4.1 Adquisición de datos y estimulación del Núcleo Medial del Rafe (NMR) en estudios sistémicos

Los electrodos de estimulación y registro se conectaron mediante un cable a un conmutador (SL2C/SB - conmutador de dos canales; Plastic One) que permitió el libre movimiento de los animales. La respuesta del campo extracelular de CA1 fue amplificada (P55 AC, Grass Instruments; West Warwick, EEUU) y almacenada en un PC a través de un sistema de adquisición de datos (e-corder E-410, eDAQ; Denistone East, Australia). Para el almacenamiento y posterior análisis de los datos fue utilizado el software Chart (eDAQ). La ventana de tiempo para la adquisición de los datos fue de una hora (60 minutos) a partir de la primera inyección de PTZ (40 mg/kg). Sin embargo cuando un animal requería mayor dosis de PTZ se extendía el registro durante quince minutos (15 minutos).

La estimulación del NMR consistió en un tren de estímulo (20Hz, 1s) monofásico (duración de 0.1 ms) con una amplitud de 150 μ A, el cual fue aplicado a través de una unidad de aislamiento de corriente constante (PSIU6; Grass Instrument) y controlada por un estimulador (S88; Grass Instrument). Este nivel de estimulación se ha encontrado no adversivo a animales en estado consciente (Mokler et al., 1999). El estímulo del NMR se realizaba solo cuando una onda convulsiva (espasmos, estadio 2) se presentaba y se aplicaba durante un

segundo (1s), con períodos de descanso de un segundo (1s) hasta la desaparición de la actividad convulsiva.

1.5 Implantación de electrodo/guía intracerebral *in vivo* para estudios con microperfusión

Para la microperfusión se implantó intracerebralmente un electrodo/guía monopolar de registro (C311GMS333-1-A Plastic One,) en la región de CA1 del hipocampo (AP:-3,6; ML:+2,0; DV:-2,6; figura 9A) con un electrodo de tierra en la corteza prefrontal (figura 10AB), lo que permitía perfundir y registrar simultáneamente en el mismo lugar. La perfusión intracerebral se realizó a través de una sonda de microdiálisis (MD-2200, 2 mm, Bioanalytical) con 2 mm de membrana (figura 9B).

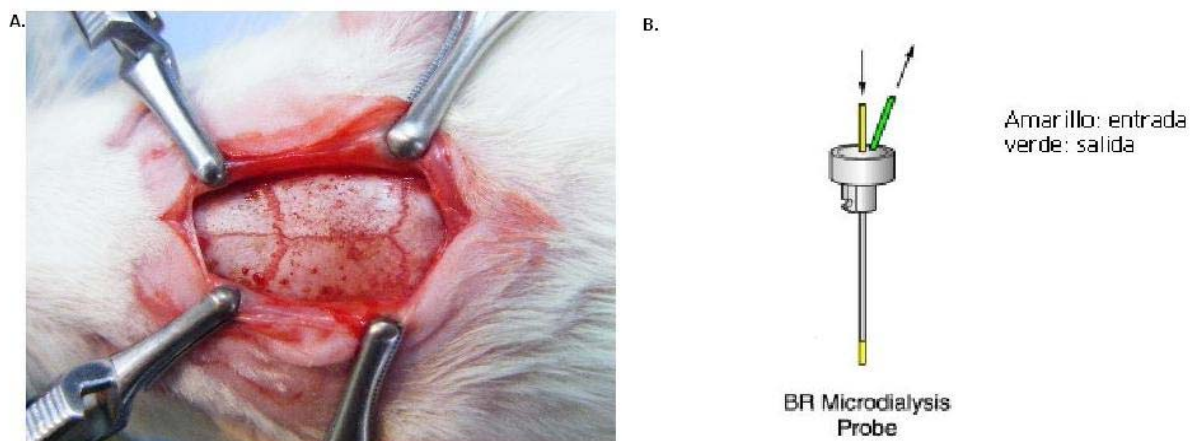


Figura 9 Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos/guía en CA1 del hipocampo para la microperfusión. **A.** Ubicación del bregma y coordenadas estereotaxicas para implantación de electrodo/guía **B.** Esquema de una sonda de diálisis con su membrana de (2 mm).

Tras ocho días de recuperación, tiempo durante el cual se realizaron los cuidados postoperatorios y mantenimiento del animal, así como se aplicaron fármacos antiinflamatorio Baytril (5 mg/kg) y rimadyl antiinfeccioso (Baytril 2,5 %). Se realizó el protocolo experimental, tiempo durante el cual el electrodo/guía fue protegido con un capuchón (303DC - Plastic One) para evitar obstrucciones o infecciones.

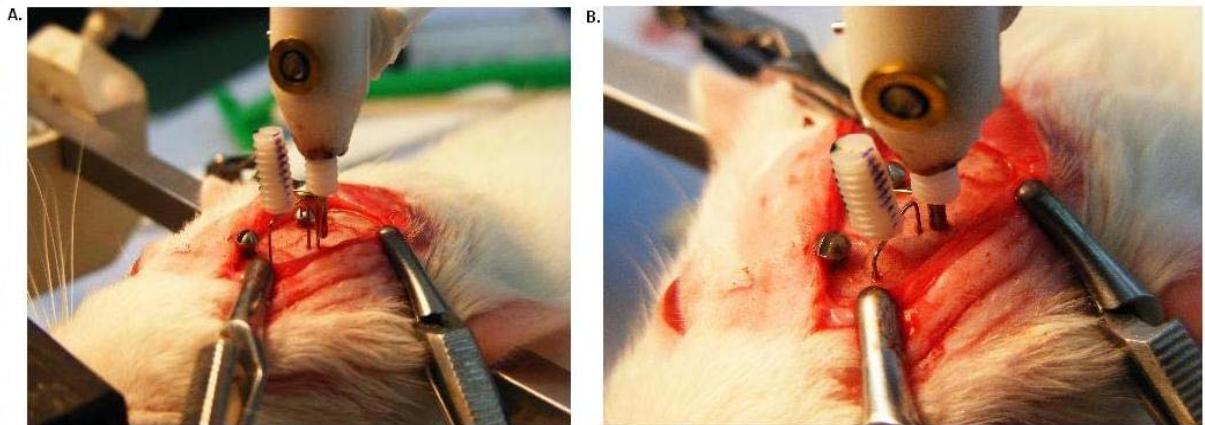


Figura 10. Secuencia fotográfica de la implantación de electrodos/guía en CA1 del hipocampo para la microperfusión. **A.** Implantación de electrodos/guía monopolar **B.** Implantación de electrodos/guía monopolar.

1.5.1 Adquisición de datos mediante microperfusión intracerebral

Todos los experimentos fueron realizados en animales despiertos a los ocho días de la cirugía. Posteriormente, tras la recuperación, los animales eran nuevamente anestesiados con isoflorano (5 % para la inducción y 2 % para el mantenimiento) para ser colocados y fijados nuevamente en un dispositivo esterotáxico a fin de introducir en el electrodo/guía la sonda de diálisis (MD-2200, 2 mm. bioanalytical) la cual permitiría perfundir mientras se obtenía la respuesta del campo extracelular desde CA1 hipocampal. Luego la sonda de diálisis se fijaba mediante cemento dental y se despertaba al animal para la realización del experimento. Con el animal despierto se perfundía FCE durante sesenta minutos mediante una bomba de perfusión (Plus Syringe Pumps Pump 11 - Harvard Apparatus) a un flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y posteriormente se procedía a hacer el protocolo de kindling con PTZ.

1.6 Análisis estadístico

Los parámetros elegidos para hacer la evaluación cuantitativa del EEG de las crisis fueron: *umbral*, se refiere a la suma acumulada de PTZ antes de generar la primera crisis convulsiva (estadio 4-5); *latencia de Inicio de crisis convulsiva*, el cual es el tiempo transcurrido desde el primera inyección de PTZ hasta la ocurrencia de espigas sincronizadas de alto voltaje y alta frecuencia asociadas

con crisis clónicas o tónicos-clónicos (estadio 4-5); *número de crisis*, número de episodios ictales que ocurren en el animal durante sesenta minutos tras el establecimiento del kindling con PTZ (estadio 4-5); y *duración media de las crisis*, tiempo medio de la duración de los episodios ictales (estadio 4-5).

Por otro lado, para el análisis de los datos en los experimentos sistémicos como con microperfusión, el rango de frecuencia de la banda gamma (> 30 Hz) fue seleccionado para actividad relacionada con convulsiones registradas por el EEG. Esta estrategia reduce fuentes de ruido por movimiento u otros artefactos, así como permite una rápida, objetiva y cuantitativa valoración de prolongada actividad eléctrica (Lehmkuhle et al., 2009). Para hacer los análisis estadísticos se empleó el software SPSS 15.0. Empleando una (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc Dunnett. Los resultados fueron expresados como el valor medio \pm SEM. Indicamos significancia si $p \leq 0.05$.

**2. ESTUDIO DE MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS
MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL RAFA (NMR) EN
UN MODELO DE *STATUS EPILEPTICUS* EN RATAS**

2.1 Sujetos y grupos experimentales

Para estos estudios se emplearon 9 ratas macho inmaduras (Sprague-Dawley) con un peso de 170 ± 30 g (Harlan Interfauna Iberica, España) mantenidas en iguales condiciones a las ya detalladas. Los animales fueron divididos en dos grupos experimentales de la siguiente manera; **(a)** grupo de control experimental en el que se indujo *SE* pero no se estimuló el NMR ($n=4$); **(b)** animales en los que se indujo *SE* y fueron estimulados una vez que se iniciaban los espasmos (estado 2) ($n=5$).

2.2 Modelo de Status Epilepticus (*SE*) mediante pentilentetrazol (PTZ) y valoración comportamental

El Status Epilepticus (*SE*) con pentilentetrazol (PTZ) ha sido empleado con anterioridad en animales jóvenes (El Hamdi et al., 1992; Pereira de Vasconcelos, 1995; Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1996; Erdoğan et al., 2004, 2005; Nehlig et al., 2006) y el protocolo consiste en aplicar una dosis inicial de 40 mg/kg, seguido de una segunda dosis de 20 mg/kg a los diez minutos y finalmente una nueva dosis de 10 mg/kg (i.p) diez minutos después. La máxima dosis acumulada de PTZ que se suministró a los animales fue, en todos los casos, de 120 mg/kg. Para determinar si se trataba de un *SE* se tenía en cuenta el tiempo (≥ 5 minutos) durante el cual la rata permanecía en crisis (Lowenstein et al., 1999; Martín et al., 2005). El *SE* es reconocido por ser una emergencia médica y esta asociado con morbilidad y mortalidad (DeLorenzo 1990_{a,b}). Esta condición de mortalidad fue igualmente evaluada en el estudio.

La evaluación comportamental del *SE* se realizó teniendo en cuenta la escala comportamental empleada por Lamberty (Lamberty y Klitgaard, 2000) a la que se añadió una puntuación adicional que indicaba que el animal había establecido un *SE*. De esta manera, se consideraba un *SE* cuando el trazo EEG mostraba un crisis de mas ≥ 5 minutos de duración y cuando el animal alcanzaba un crisis convulsiva comportamental de seis en la escala.

2.3 Implantación de electrodos y estimulación del Núcleo Medial del Rafe (NMR) en animales jóvenes

Con el Bregma como referencia para hipocampo y Lambda para NMR se implantó dos electrodos de acero inoxidable; un electrodo monopolar de registro (MS333/1-A - Plastic One, Bilaney Consultants; Dusseldorf, Alemania) en la región CA1 hipocampal (AP:-3,1; ML:+2,1; DV:-2,0) con un electrodo de tierra en la corteza prefrontal y un electrodo de referencia en el parietal. Y otro electrodo bipolar para estimulación (MS333/1-B - Plastic One, Bilaney Consultants; Dusseldorf, Alemania) en el Núcleo Medial del Rafe (NMR) (AP +1.2, L +1.4, DV - 5.0) en un ángulo de 20° para evitar bloquear el acueducto cerebral y prevenir daño del vaso cerebral medio (Mokler et al., 1998, 1999).

Todos los experimentos fueron realizados en animales libres y consientes tras ocho días de recuperación. Los electrodos de estimulación y registro eran conectados mediante un cable conector (SL2C/SB - conmutador de dos canales; Plastic One, Bilaney Consultants; Dusseldorf, Alemania) que permitió libre movilidad de los animales. La respuesta del campo extracelular desde CA1 fue amplificada (P55 AC, Grass Instruments; West Warwick, EEUU) y registrada en un PC a través del sistema de adquisición (e-corder E-410, eDAQ; Denistone East, Australia). Para el almacenamiento y posterior análisis de los datos fue utilizado el software Chart (eDAQ). Así mismo, la ventana de tiempo para la adquisición de los datos fue de dos horas (120 minutos) e inicia desde la primera inyección de PTZ (40 mg/kg). El estímulo eléctrico en el NMR consistió en un tren de estímulo (20Hz, 1s) de pulso monofásico (duración de 0.1 ms) con una amplitud de 150 μ A, el cual fue aplicado a través de una unidad de aislamiento de corriente constante (PSIU6; Grass Instrument) y controlada por un estimulador (S88; Grass Instrument). Este nivel de estimulación se ha demostrado que no es aversivo a animales es estado consientes (Mokler et al., 1999). La estimulación en el NMR era dada solo cuando se presentaba una onda convulsiva (espasmos) y era generado de la siguiente manera: un estímulo (1), durante un segundo (1s) se paraba un segundo (1s) y luego se generaba otro estímulo similar al anterior (1s), así hasta que la actividad convulsiva desaparecía.

2.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron los mismos a los realizados en el primer estudio de kindling con PTZ, de esta manera lo primero que se realizó fue caracterizar el trazo electroencefalográfico (EEG) del SE inducidos por el PTZ y Posteriormente hacer un análisis cuantitativo de los parámetros EEG más importante que están presentes durante la modulación de las crisis epilépticas por estimulación eléctrica del núcleo medial del rafe (NMR). Los parámetros elegidos para hacer la evaluación cuantitativa del EEG de las crisis fueron: *Umbral*, se refiere a la suma acumulada de PTZ antes de generar la primera crisis convulsiva (estadio 4-5); *Latencia de Inicio de crisis convulsiva*, el cual es el tiempo transcurrido desde el primera inyección de PTZ hasta la ocurrencia de espigas sincronizadas de alto voltaje y alta frecuencia asociadas con crisis clónicas o tónicos-clónicas (estadio 4-5); *Número de crisis*, número de episodios ictales que ocurren en el animal durante sesenta minutos tras el establecimiento del kindling con PTZ (estadio 4-5); y *Duración media de las crisis*, tiempo medio de la duración de los episodios ictales (estadio 4-5). Además se tubo en cuenta la mortalidad generada por e SE.

Así mismo para el análisis de los datos en los experimentos se tubo en cuenta a la hora de considerar un SE el tiempo (≥ 5 minutos) durante el cual la rata permaneció en crisis. Además un rango de frecuencia cercano a la banda gamma (30 Hz) fue seleccionado para actividad relacionada con convulsiones registradas por el EEG. Esta estrategia reduce fuentes de ruido por movimiento u otros artefactos, así como permite una rápida, objetiva y cuantitativa valoración de prolongada actividad eléctrica (Lehmkuhle et al., 2009). Para hacer los análisis estadísticos se empleo el software SPSS 15.0. Empleando una (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc Dunnett. Los resultados son expresados en medias \pm SEM. Indicamos significancia si $p \leq 0.05$. Para el análisis estadístico se llevó a cabo con el software SPSS 15.0, empleando una *t student* para muestras independientes. Los resultados son expresados en medias \pm SEM. Se consideran que existe significancia si $p \leq 0.05$.

3 ESTUDIO MEDIANTE TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET) DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS QUE SUCEDEN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN UN MODELO DE EPILEPSIA *IN VIVO* POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE PENTILENTETRAZOL (PTZ)

3.1. Sujetos y grupos experimentales

Para todos los experimentos se emplearon ratas macho (Sprague-Dawley) con un peso de 300 ± 30 g mantenidas en las condiciones ya detalladas. Para los estudios estáticos se emplearon 10 ratas, mientras que en los estudios dinámicos se utilizaron 3 animales. La actividad EEG fue registrada a través de electrodos implantados con ocho días de anterioridad. En los estudios dinámicos y estáticos los animales se dejaron en ayunas durante seis horas para evitar así la interferencia de la glucosa plasmática con el radiotrazador ^{18}F -FDG. Para asegurar la inmovilización durante los registros con el Micro-PET, las ratas fueron anestesiadas inhalatoriamente mediante isoflurano a una concentración de 2% en 100% de oxígeno. Cada animal fue utilizado como su propio control, para ello se les realizó un estudio basal antes de la realización del escáner con PTZ.

3.2 Equipo de Micro-PET

El equipo utilizado en los experimentos fue un tomógrafo Albira PET de OncoVision (Valencia) de la unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar. El Micro-PET cuenta con una resolución de 1.5 mm y un campo axial de 4 cm y transaxial de 8 cm. Todas las imágenes se reconstruyeron mediante el algoritmo OSEM cross (3 iteraciones) y se les aplicaron las correcciones de tiempo muerto, “decay” y “random”. En los estudios estáticos se adquirieron 6 frames de 10 minutos cada uno y en los estudios dinámicos se realizaron adquisiciones de 27 frames de diferente duración (4x15”; 4x30”; 4x60”; 4x120”; 5x180”; 4x300”; 2x600”).



Figura 11. Tomógrafo Albira PET de Onco Vision – Unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar – UCM.

3.3 Modelo de kindling químico y valoración comportamental

Para la generación de crisis epilépticas en los estudios estáticos se utilizó el mismo protocolo de administración para el kindling químico con PTZ ya descrito, mientras que en los estudios dinámicos se administró únicamente una dosis convulsiva de PTZ (70mg/kg). En ambos casos se realizó una valoración comportamental teniendo en cuenta la escala de Lamberty (Lamberty y Klitgaard, 2000).

3.4 Estudios de adquisición estática de PET

El estudio basal y el kindling con PTZ fueron realizados con dos días de separación entre ellos. Primero se les inyectó el radiotrazador ^{18}F -FDG (500 μCi) intraperitonealmente (i.p) para evitar que la anestesia interfiriera en la actividad del PTZ. Cinco minutos después de la aplicación del radiotrazador, se comenzó el protocolo de kindling químico con PTZ descrito anteriormente.

Treinta minutos después de iniciada la crisis convulsiva se anestesió al animal con Isoflorano (5 % para la inducción y 2 % para el mantenimiento) y se comenzó el estudio PET consistente en 6 frames de 10 minutos cada uno.



Figura 12. Representación cronológica del estudio estático. Se administra FDG antes de comenzar el protocolo de PTZ. Treinta minutos después de que se produzca una crisis de nivel 4 ó 5 comienza la adquisición PET.

Par los estudios basales cada animal fue utilizado como su propio control, de esta manera en los controles se empleo el mismo protocolo descrito anteriormente inyectando en cada ocasión NaCl 0.9 %, en vez del pentilentetrazol (PTZ).

3.5 Analisis de datos obtenidos con el Micro-PET

Para el análisis de las regiones de interés del cerebro del animal en cada condición experimental, se utilizó el programa informático especializado PMOD (versión 2.9). Los pasos realizados para el análisis de las imágenes se resumen a continuación. Para cada rata, la imagen PET obtenida se normalizó por la actividad de ^{18}F -FDG inyectada al animal corregida al inicio del estudio PET. La imagen obtenida se fusionó con una imagen de resonancia magnética (MRI) del mismo animal obtenida antes de la realización del experimento. Cada imagen de MRI a su vez se corrigió al template de resonancia magnética de Petra (Schweinhardt et al., 2003), aplicando los parámetros del correregistro a las imágenes PET correspondientes de cada animal. Sobre la imagen de MRI se utilizaron los volúmenes de interés (VOIs) de las distintas áreas cerebrales establecidas por Schiffer (Frumberg et al., 2007). Posteriormente los VOIs se trasladaron a la imagen estática de PET (un promedio de los 6 frames), permitiendo obtener así la actividad para cada región normalizada a la dosis inyectada. Los resultados obtenidos para cada estructura se expresan en función de la actividad captada por la misma (mCi).

3.6 Estudios de adquisición dinámica de PET

3.6.1 Implantación de electrodos

Luego de anestesiarse el animal con isoflurano y una vez fijado en el marco estereotáxico, se le implantó un electrodo monopolar (MS333/1-A, Plastic One) en la corteza motora (AP:+2,4; ML:-2,8; DV:-1,2), un electrodo de tierra en la corteza prefrontal y un electrodo de referencia en el parietal. Se utilizaron 2 tornillos (0-80 Screw-Holding, PlasticOne) para fijar los electrodos al cráneo con cemento dental. Posteriormente se dejó 8 días para la recuperación de los animales tras la operación antes de comenzar los experimentos, tiempo durante el cual se realizaron los cuidados postoperatorios de cuidado y mantenimiento del animal, así como se aplicó de fármacos antiinflamatorio Baytril (5 mg/kg) y rimadyl antiinfeccioso (Baytril 2,5 %).

3.6.2 Método de adquisición dinámica de PET

Los estudios de adquisición dinámica se realizan con la rata anestesiada. El PTZ y el ^{18}F -FDG fueron administrados prácticamente de forma simultánea y coincidiendo con el inicio del escáner. El PTZ, en esta ocasión se administró únicamente una dosis convulsiva de 70 mg/kg. El radiotrazador, en estos estudios, se administró por vía intravenosa con una dosis de ^{18}F -FDG de 400 μCi . Las adquisiciones fueron de 27 frames de diferente duración (4x15"; 4x30"; 4x60"; 4x120"; 5x180"; 4x300"; 2x600).

Partiendo del hecho que tanto la medida del metabolismo cerebral de la glucosa a partir de la PET como la actividad eléctrica cerebral medida mediante EEG reflejan directa o indirectamente los mismos mecanismos de actividad neuronal (Ebersole et al., 2002; Aubert et al., 2004; Shulman et al., 2004; Furió 2010), durante la adquisición PET se registró la actividad eléctrica en la corteza motora.

3.7 Análisis estadísticos de resultados estáticos y dinámicos

En los estudios estáticos se realizó un test ANOVA a la actividad media de cada VOI en ambos grupos: control y PTZ. Para este análisis se calculó la actividad media de las estructuras cerebrales de cada animal y, con éstas, se obtuvo una actividad media por estructura de cada grupo. El test estadístico se aplicó a estas medias con sus respectivas desviaciones. En los estudios dinámicos se analizaron las constantes cinéticas de la incorporación de ^{18}F -FDG en cada uno de los grupos. Al igual que en los estudios estáticos se halló un promedio de la constante cinética para cada uno de los grupos. El test estadístico al que fueron sometidos estos datos fue el modelo lineal general.

**4 ESTUDIO DE FIJACIÓN DE RADIOLIGANDOS MEDIANTE
AUTORRADIOGRAFÍA EN ANIMALES TRATADOS CON
PENTILENTETRAZOL (PTZ)**

4.1 Sujetos y grupos experimentales

Para la autorradiografía con $^{18}\text{MPPF}$ se emplearon cortes histológicos de cerebro de ratas maduras que habían sido implantadas y sometidas a kindling químico del estudio 1. Luego de los experimentos, los animales fueron profundamente anestesiados con isoflorano, decapitados y el cerebro extraído rápidamente para luego ser congelado mediante inmersión en isopentano y conservado a -80°C . Posteriormente, las rodajas de hipocampo y NMR de los cerebros fueron cortados en un criostato (Leica CM1850, Germany) en rodajas de $20\text{ }\mu\text{m}$ de grosor y puestos sobre unos portaobjetos de vidrio (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) previamente gelatinizados y almacenados nuevamente en un frigorífico a -80°C para posterior autorradiografía. Los cortes fueron divididos en cuatro grupos experimentales de la siguiente manera: **a)** rodajas de animales tratados con PTZ y estimulados en el NMR, **b)** rodajas de animales tratados con PTZ sin estimular el NMR, **c)** rodajas de animales sin PTZ y estimulados en el NMR, **d)** animales sin PTZ y sin estimulación en el NMR.

4.1.1 Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con $^{18}\text{MPPF}$

Para la autorradiografía con $^{18}\text{MPPF}$ se siguió el protocolo descrito por Riad (Riad et al., 2004), con ligeras modificaciones. Básicamente, el procedimiento a seguir fue el siguiente: las rodajas de los diferentes grupos experimentales fueron descongeladas con aire frío para evitar el daño y los cortes de $20\text{ }\mu\text{m}$ se introdujeron en un estuche “coplin jar” para dejar preincubar con Tris-HCL (50 Mm a 7.5 PH) durante 5 minutos. El objetivo de la preincubación es eliminar los ligandos endógenos (neurotransmisores) del tejido, así como los fármacos residuales que pueden haber quedado unidos al transportador de 5-HT_{1A} como consecuencia de los experimentos realizados con anterioridad. Algunos de estos productos podría competir con el ligando radioactivo en la fijación en su lugar de unión, dando como resultado interferencias en el marcaje. Posteriormente, se realiza la incubación y para ello se llena el “coplin jar” con Tris-HCL+MPPF ($227\text{ }\mu\text{Ci}$ en 250 ml de Tris-HCL) y se deja reposar durante 20 minutos, a continuación se lava con agua fría y se expone durante 60 minutos en una película autorradiográfica (Kodak BIOMAX X-AR) para posteriormente hacer

el revelado manual. El procedimiento de revelado manual fue el siguiente: en la habitación oscura se sumergió la película en líquido revelador (5 minutos); a continuación, se lavó en agua corriente (1 minuto) y, para finalizar, se sumergió en líquido fijador (5 minutos). Finalmente, se dejó secar con aire caliente.

4.2 Estudio autorradiográfico con $^{18}\text{MPPF}$ y $^{18}\text{F-FDG}$ en una rata *ex vivo*

Se realizó un único estudio autorradiográfico en una rata *ex vivo*, a la cual no se le implantaron electrodos pero se le inyectó intrahipocampalmente PTZ con el objetivo de hacer autorradiografía con $^{18}\text{F-FDG}$ y posteriormente con $^{18}\text{MPPF}$. El protocolo experimental para esta rata fue el siguiente: se dejó la rata en ayunas (12 horas) antes del experimento y posteriormente fue anestesiada en una cámara de anestesia con Isoflorano (5 % para la inducción y 2 % para el mantenimiento). Luego de ser fijado en el marco estereotáxico se aplicó en el hipocampo (AP:-3,6; ML:+2,0; DV:-2,6) mediante una aguja Hamilton (Hamilton-Stoelting, Inc), durante 5 minutos, una dosis única de PTZ (1 mg/5 μl) la cual fue disuelta en fluido cerebroespinal artificial (NaCl 147 mM, KCl 3 mM, CaCl_2 1.2 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes 10 mM). Al mismo tiempo que se inyectaba intrahipocálicamente el PTZ, se administró por vía intravenosa (i.v) $^{18}\text{F-FDG}$ (55 MBq en aprox. 0.2 ml de solución salina) y con el animal despierto se dejó incorporar el $^{18}\text{F-FDG}$ durante treinta minutos antes de hacer sacrificar el animal y hacer el protocolo de autorradiografía.

4.2.1 Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con $^{18}\text{MPPF}$ Y $^{18}\text{F-FDG}$

Primero se realizó la autorradiografía *ex-vivo* con $^{18}\text{F-FDG}$ y posteriormente con $^{18}\text{MPPF}$. De esta manera treinta minutos después de la administración de la $^{18}\text{F-FDG}$ el animal fue sacrificado y el cerebro congelado en isopentano. El cerebro fue cortado usando un criostato (Leica CM1850) en secciones de 40 μm de grosor y los cortes fueron puestos en portaobjetos de vidrio y descongelados con aire frío para evitar el daño. A continuación, las rodajas fueron expuestas sobre una película autorradiográfica (Agfa Curix RP2 Plus) una durante hora. Tras ese tiempo, las películas se revelaron manualmente y fueron secadas empleando

aire caliente. Posteriormente, a esos mismos cortes se les realizó el mismo protocolo de autorradiografía empleado con anterioridad con Tris-HCL+ $^{18}\text{MPPF}$ varios días después, tiempo durante el cual se dejó decaer toda la actividad de la $^{18}\text{F-FDG}$.

4.3 Captura de imágenes y análisis de datos

Las imágenes fueron capturadas digitalmente a 1300 x 1030 pixeles de resolución (Leica DC300F) y procesadas con el software ImageJ v 1.37 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). En la autorradiografía con $^{18}\text{MPPF}$ se realizó análisis estadístico con el software SPSS 15.0 empleando una ANOVA con una post hoc de Tukey. En el caso de la autorradiografía ex –vivo, dado que se tenía solo un sujeto experimental se empleó un análisis teniendo en cuenta el porcentaje.

4.3.1 Tinción de Nissl

Para la comprobación histológica en los diferentes grupos experimentales de la posición de los electrodos y cánulas, se empleó la tinción de Nissl. El objetivo de esta técnica fue aumentar el contraste relativo de determinadas estructuras (hipocampo y NMR). Se empleó el azul de toluidina que debido a su carácter básico posee una elevada afinidad por los ácidos nucleicos de las neuronas. Dado que el soma de las neuronas posee grandes concentraciones de ácidos nucleicos en el núcleo, el nucleolo y ribosomas (en particular los adheridos al retículo endoplasmático rugoso o sustancia de Nissl), la técnica produce una tinción clara y definida de los somas neuronales mostrando una panorámica general de la distribución y organización cito arquitectónica bastante clara de la neurona (Rodríguez et al., 2006).

IV. RESULTADOS

- 1. ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS
MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL
RAFE (NMR) EN UN MODELO DE KINDLING QUÍMICO**

1.1 Análisis electroencefalográfico del kindling con pentilentetrazol

Para el análisis de la actividad electroencefalográfica que sucede al suministrar PTZ en animales in vivo se empleo una ventana de tiempo de una hora (60 minutos) el cual iniciaba desde la primera inyección de PTZ (40 mg/kg). Durante este tiempo de adquisición el fenómeno grafológico del electroencefalograma presentan cambios en el trazo los cuales están relacionados con los cambios comportamentales que presentan los animales durante las crisis, estos incluyen: congelamiento, tirones mioclónicos (posición de canguro), ataques clónicos y ataques tónico-clónicos (Velíšek, 2006). Con anterioridad el análisis de trazo electroencefalográfico y su relación con la actividad comportamental durante el kindling químico con PTZ se había realizado empleando otro protocolos (Ono et al., 1990), así como en otros modelos en animales y en humanos (Rojo et al., 2001; Menendez de la Prida et al., 2002;2003), sin embargo para la presente tesis hacer un análisis del fenómeno EEG en animales y su relación con el comportamiento durante las crisis es importante, dado que el inicio de la estimulación del Núcleo Medial de Rafe (NMR) era generada cuando una onda convulsiva (espasmos) (estadio 2) sucedía en el animal el cual se correlacionaba con ondas rítmicas agudas de entre 5-7 Hz.

1.1.1 Cambios comportamentales y correlación electroencefalográfica

Durante el estadio 0 los animales tratados con PTZ no mostraban cambios comportamentales, mientras que en el estadio 1, los animales presentaban un movimiento de cabeza rítmico de entre 3-4 segundos que no involucraba las extremidades. En el estadio 0 y 1 el EEG presentaba una actividad normal con ocasionales ondas rítmicas agudas de 4 a 5 Hz (Fig. 13) que se correlacionaban con las contracciones de la cabeza en el estadio 1.



Figura 13. Registro electroencefalográfico durante los estadios 0 y 1 respectivamente con ocasionales ondas rítmicas agudas de entre 4-5 Hz. Este tipo de patrón del potencial de campo esta altamente correlacionado con el comportamiento durante las crisis. Registro monopolar en CA1 hipocampal.

Por otro lado, durante el estadio 2 los animales presentaban momentáneamente contracciones musculares en todas las extremidades del cuerpo y que comportamentalmente se manifestaban como pequeños saltos hacia atrás. Estos saltos ocurrían de manera continua y duraban entre 1-35 segundos. Los cambios observados en el estadio 2 son fáciles de reconocer así como de puntuar y es una de las características más frecuentes que suceden durante las crisis inducidas por el PTZ. Por lo tanto, fue utilizado en nuestro modelo para iniciar la estimulación en el NMR. Igualmente, este tipo espasmos en algunas oportunidades también se presentaba acompañado con o sin movimientos estereotipados de la cabeza. El EEG característico en este estadio era de múltiples espigas de entre 5-7 Hz (Fig. 14), igualmente se podían observar espigas solitarias visibles en el trazo del EEG.



Figura 14. Registro electroencefalográfico durante el estadios 2 (ondas convulsivas o espasmos) con ondas rítmicas agudas de entre 5-7 Hz. Este tipo de patrón del potencial de campo esta altamente correlacionado con el comportamiento durante las crisis. Registro monopolar en CA1 hipocampal.

El estadio 3 se caracteriza por ser el inicio de una crisis convulsiva en el animal, este tipo de crisis usualmente progresa a convulsiones clónicas de las extremidades superiores, caída y finalmente a una crisis tónico-clónica en todas las extremidades (Ono et al., 1990). Durante este estadio una de las características mas visibles es la denominada posición de canguro, la cual consiste en una postura erguida seguida de continuos movimientos de los miembros superiores que conlleva a una posterior perdida del equilibrio y espasmos intermitentes. Diferente al estadio 2 el cual presentaba anomalías con espigas solitarias, el estadio 3 se caracteriza por tener espigas continuas y ondas complejas de gran amplitud cuya frecuencia fluctúa entre los 10 y 12 Hz (Fig. 15).

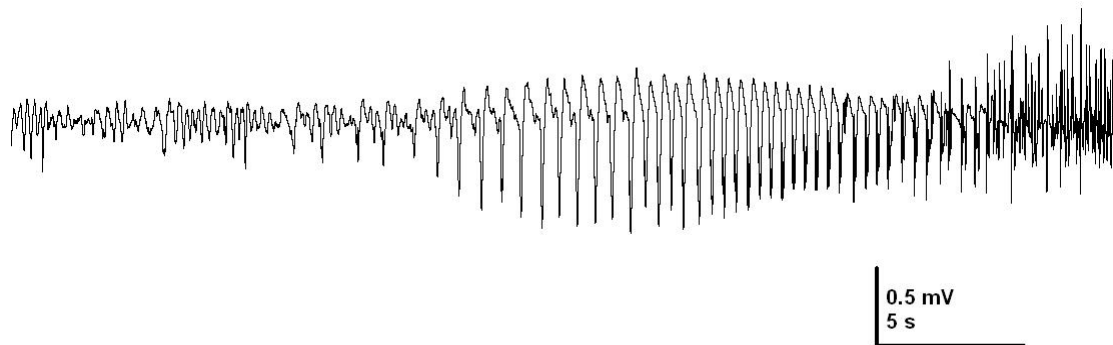


Figura 15. Registro electroencefalográfico durante el estadíos 3 (Sacudidas mioclónicas en las extremidades anteriores (postura de canguro) con espigas continuas y ondas complejas que fluctúan entre los 10-12 Hz. Este tipo de patrón del potencial de campo esta altamente correlacionado con el comportamiento durante las crisis. Registro monopolar en CA1 hipocampal.

Por su parte el estadio 4-5 se caracteriza porque el animal ha progresado a convulsiones clónicas en todas las extremidades, caída sobre el costado para el caso del estadio 4 y convulsiones tónico-clónicas en todas las extremidades, caída sobre la espalda en el caso del estadio 5. Los animales usualmente alcanzaban este estadio luego de tener una dosis acumulada de 70 mg/kg de PTZ. Por su parte, el EEG refleja anomalías en el trazo con ondas complejas y espigas continuas que fluctúan entre los 20-30 Hz (Fig. 16). Para los análisis y por razones prácticas se utilizó el rango de frecuencia de la banda gamma (30 Hz) para relacionarlo con los estadios 4-5 para hacer los respectivos análisis estadísticos. Esta estrategia reduce fuentes de ruido por movimiento u otros artefactos y permite una rápida, objetiva y cuantitativa valoración de la prolongada actividad eléctrica (Lehmkuhle et al., 2009).

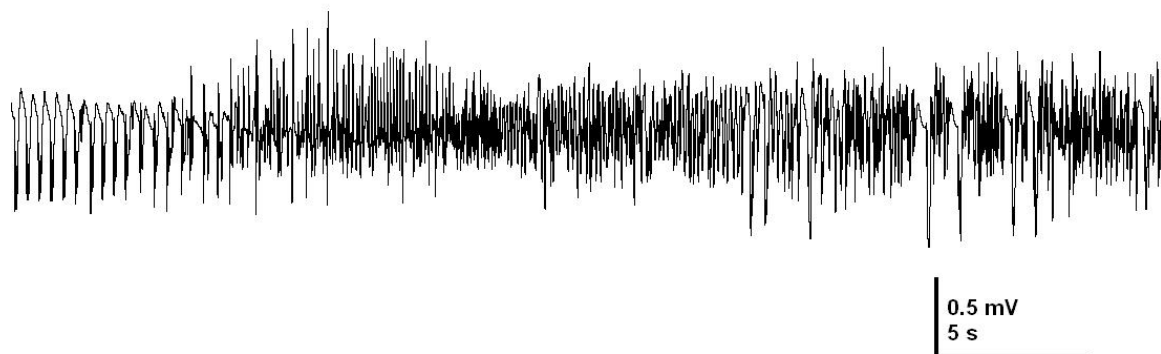


Figura 16. Registro electroencefalográfico durante los estadios 4 y 5 con espigas continuas y ondas complejas que fluctúan entre los 20-30 Hz. Este tipo de patrón del potencial de campo esta altamente correlacionado con el comportamiento durante las crisis. Registro monopolar en CA1 hipocampal.

Por último, al finalizar las crisis el EEG muestra una severa depresión post ictal (Fig. 17) la cual esta relacionada con total inactividad en el comportamiento del animal.

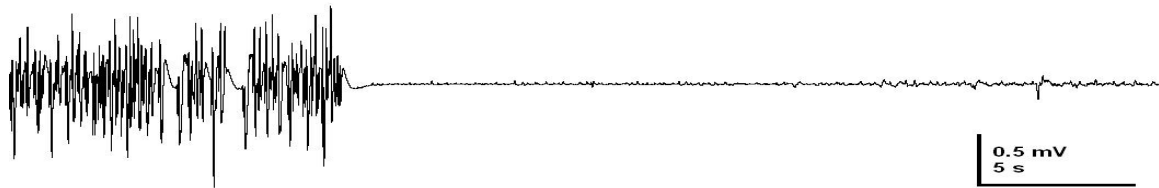


Figura 17. Registro electroencefalográfico durante la depresión post ictal luego de una crisis. Este tipo de patrón del potencial de campo esta altamente correlacionado con el comportamiento durante las crisis. Registro monopolar en CA1 hipocampal.

1.2 La estimulación del Núcleo Medial de Rafe reduce la actividad convulsiva inducida por pentilentetrazol

Los animales del grupo control ($n = 8$) en los que el PTZ fue administrado sin estimular el NMR, presentaron actividad epileptiforme en el 100% de los casos. Además, se observó que un alto porcentaje de los animales controles (75 %) alcanzaban una crisis convulsiva (estadio 4-5) con una dosis acumulada de 70 mg/kg de PTZ (tabla 4). Por otro lado, en el grupo de animales en los que se estimuló el NMR al inicio del estadio 2 ($n = 12$), tan solo el 33.3% desarrollaron crisis convulsivas (estadio 4-5) y en solo el 25 % se establecieron crisis convulsivas (estadio 4-5) con una dosis acumulada de PTZ de 80 mg/kg. Estos dato nos indican que la estimulación del NMR reduce en un alto porcentaje (66.7%) el desarrollo de las crisis convulsivas (estadio 4-5) inducidas con PTZ (tabla 4).

Tratamiento del grupo	Umbral (mg/kg)			
	40	60	70	80
PTZ (8)	0	0	75	25
PTZ+NMR Estimulación (12)	0	0	8,3	25
WAY100635+ Estimulación NMR (8)	0	100	0	0
WAY100635+PTZ (8)	50	50	0	0
SB269970+PTZ+Estimulación NMR (8)	0	100	0	0
SB269970+PTZ (8)	0	100	0	0
SB242084+PTZ+Estimulación NMR (8)	0	12,5	87,5	0
SB242084+PTZ (8)	15,5	87,5	0	0

Tabla 4. Porcentaje de animales, en diferentes condiciones experimentales, que alcanzan convulsiones tónico-clónicas (Estadios 4 y 5) tras la administración de dosis acumulada de PTZ (40- 80 mg / kg).

Por otro lado, los registros electroencefalográficos en la fase tónico-clónico se caracterizaron por complejos punta-onda de alta frecuencia en la fase ictal y que posteriormente generaron una evidente depresión potsictal (Fig. 18A). Por su parte, la estimulación del NMR, solo cuando las ondas convulsivas (espasmos) se presentaban (estadio 2), redujo sustancialmente la actividad convulsiva generada por el PTZ cuando se compararon con el grupo control (Fig. 18B). La media de estímulos requeridos para controlar la crisis inducidas con PTZ en el grupo de NMR-ST fue de 16.4 ± 1.6 (Fig. 21; Tabla 5; $n = 12$). En estas condiciones se observó que, en los animales en los que se estimuló el NMR, había un aumento significativo de la dosis acumulada de PTZ antes de alcanzar el umbral de generación de las crisis convulsiva (Fig. 19A; $n = 12$; $p < 0.05$), así como un incremento en el tiempo al inicio de las crisis (Fig. 19B; $n = 12$; $p < 0.001$). Por otra parte, se vio una significativa reducción en el número (Fig. 20A; $n = 12$; $p < 0.001$) y duración de las crisis (Fig. 20B; $n = 12$; $p < 0.001$) comparado con el grupo control. Estos datos, analizados en su conjunto, nos indican que la estimulación del NMR controla efectivamente las crisis inducidas por PTZ.

1.3 El efecto antiepiléptico de la estimulación del Núcleo Medial del Rafe (NMR) es mediado por receptores serotoninérgico 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} y 5HT₇

Tras determinar que la estimulación del NMR modulaba las crisis convulsivas en el modelo de kindling químico con PTZ, se procedió a investigar el efecto de diferentes antagonistas serotoninérgicos a fin de evaluar el rol de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₇ en el efecto antiepiléptico de la estimulación del NMR.

El tratamiento con el antagonista de 5-HT_{1A} WAY100635 (1 mg/kg, s.c) previo a la estimulación del NMR, redujo el umbral (Fig. 19A; n = 8; p < 0.01) y latencia al inicio de las crisis (Fig. 19B; n = 8; p < 0.001), contrarrestando la reducción del número de crisis (Fig. 20A; n = 8) y la duración de las crisis (Fig. 20B; n = 8) inducidos por la estimulación del NMR. La media de estímulos aplicados en cada crisis en este grupo experimental fue de 57.9 ± 2 (Fig. 21; n = 8; p < 0.001). Todos los animales en este grupo experimental (100 %) desarrollaron crisis tónico-clónicas (estadio 4-5) con una dosis acumulada de 60 mg/kg de PTZ (Tabla 4). Por otro lado, durante el tratamiento con WAY100635 (1 mg/kg, s.c) sin estimulación del NMR, se encontró que se redujo significativamente el umbral (Fig. 19A; n = 8; p < 0.01) y la latencia del inicio de las crisis (Fig. 19B; n = 8; p < 0.001), incrementándose el número de crisis (Fig. 20A; n = 12; p < 0.001) inducidas por PTZ. Además, el WAY100635 facilitó las crisis a bajas dosis de PTZ dado que, en este grupo, el 50% de los animales experimentaron crisis tónico-clónicas (estadio 4-5) con una dosis acumulada de 40 mg/kg de PTZ (Tabla 4). El pretratamiento con SB269970 (10 mg/kg, i.p), un antagonista de 5-HT₇, también contrarrestó el umbral (Fig. 19A; n = 8; p < 0.01) y latencia al inicio de las crisis (Fig. 19B; n = 8; p < 0.001), contrarrestando la reducción en el número de crisis (Fig. 20A; n = 8) y la duración de las crisis (Fig. 20B; n = 8) inducidos por la estimulación del NMR. En este caso, el número de estímulos medios durante cada crisis fue de 68.1 ± 3.9 (Fig. 21; n = 8; p < 0.001). Todos los animales en este grupo experimental (100 %) desarrollaron crisis tónico-clónicas (estadio 4-5) a una dosis acumulada de 60 mg/kg de PTZ comparado con el grupo control (Tabla 4). De forma similar al WAY100635, el pretratamiento con el antagonista de 5-HT₇ en ausencia de estimulación del NMR, redujo el

umbral (Fig.19A; $n = 8$; $p < 0.01$) así como la latencia del inicio de las crisis convulsivas (Fig. 19B; $n = 8$; $p < 0.001$), aumentando significativamente el número de crisis (Fig. 20A; $n = 12$; $p < 0.001$). La totalidad de animales de este grupo experimental (100%) desarrollaron crisis tónico-clónicas (estadio 4-5) con dosis acumuladas de 60 mg/kg de PTZ.

Finalmente, la estimulación del NMR fue efectiva para reducir el número de crisis (Fig. 20A; $n = 8$; $p < 0.01$) y duración de las crisis (Fig. 20B; $n = 8$; $p < 0.001$) luego de pretratamiento con SB202484 (0.2 mg/kg, i.p), un antagonista de 5-HT_{2c}. Además, se encontró diferencias significativas en el número de crisis (Fig. 20A; $n = 8$; $p < 0.001$) o duración de las crisis (Fig. 20B; $n = 8$; $p < 0.05$) cuando estos animales eran comparados con ratas sin tratamiento de SB242084 (Fig. 20). En este grupo experimental, el 87.5 % de los animales con SB242484 presentaron crisis tónico-clónicas (estadio 4-5) a 70 mg/kg (tabla 4). La media de estímulos durante cada crisis fue de 32.6 ± 2.7 (tabla 5; $n = 8$; $p < 0.001$). Por otra parte, la administración sistémica de SB242084 sin estimulación del NMR no cambia el número o duración de las crisis pero reducen el umbral e inicio de las crisis con PTZ (Fig. 19AB; $n = 8$; $p < 0.001$). Estos datos, analizados en conjunto, nos sugieren que el efecto antiepiléptico que se genera por la estimulación del NMR en el modelo de kindling químico con PTZ es mediado por los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2c} y 5-HT₇.

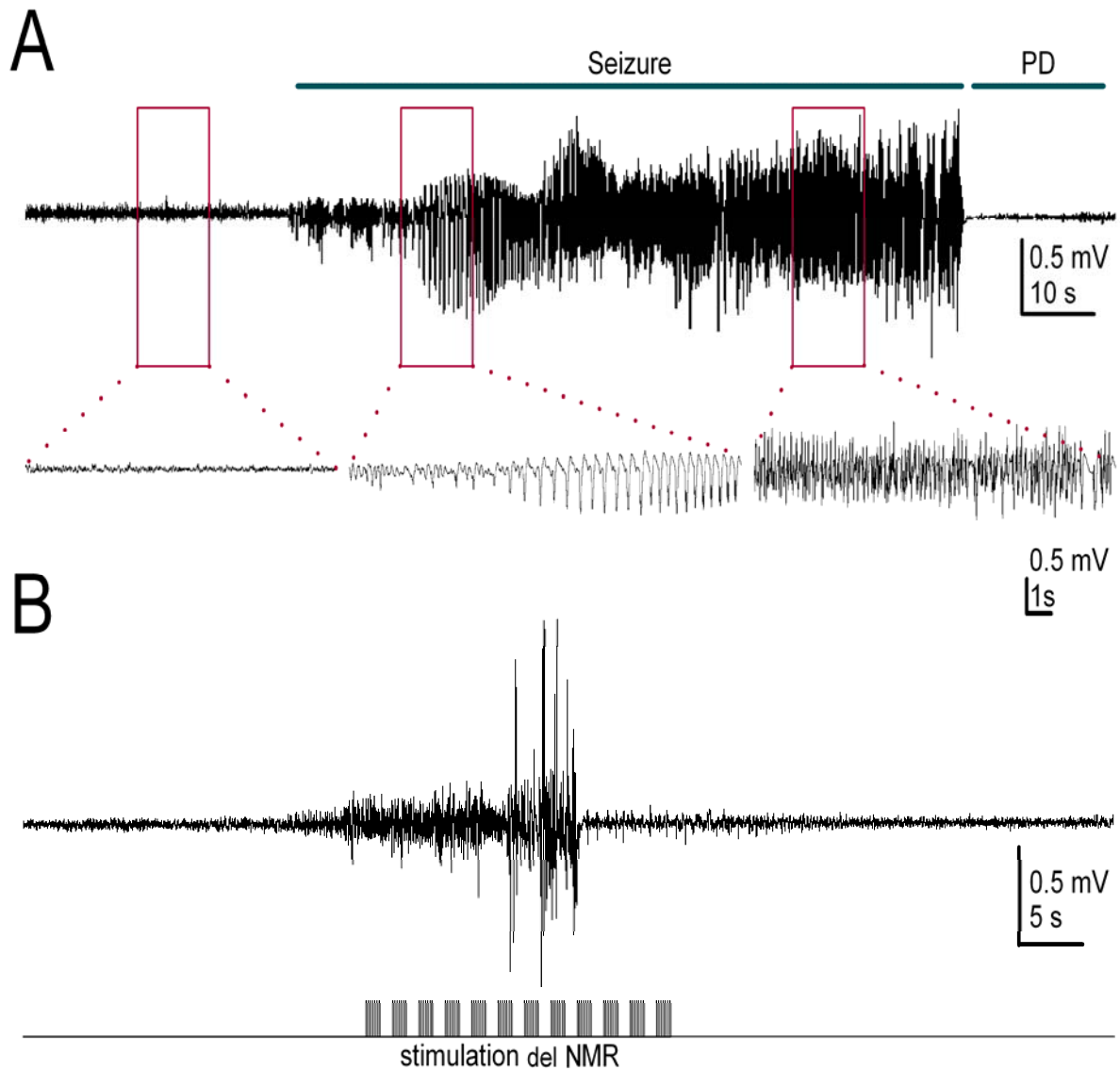


Figura 18. La estimulación del Núcleo Medial del Rafe (NMR) suprime las crisis tónico-clónicas inducidos con pentilentetrazol (PTZ) en el hipocampo. (A) Registro representativo de la actividad basal de la región CA1 del hipocampo derecho y evolución de las descargas convulsivas tras la administración de PTZ (dosis acumulada de 70 mg/kg) en un animal control. (B) La estimulación del NMR suprime las crisis inducidas por PTZ; nótese la ausencia de crisis tónico-clónicas. El estímulo era aplicado solo cuando se presentaban ondas convulsivas (espasmos). PD: Depresión post-ictal.

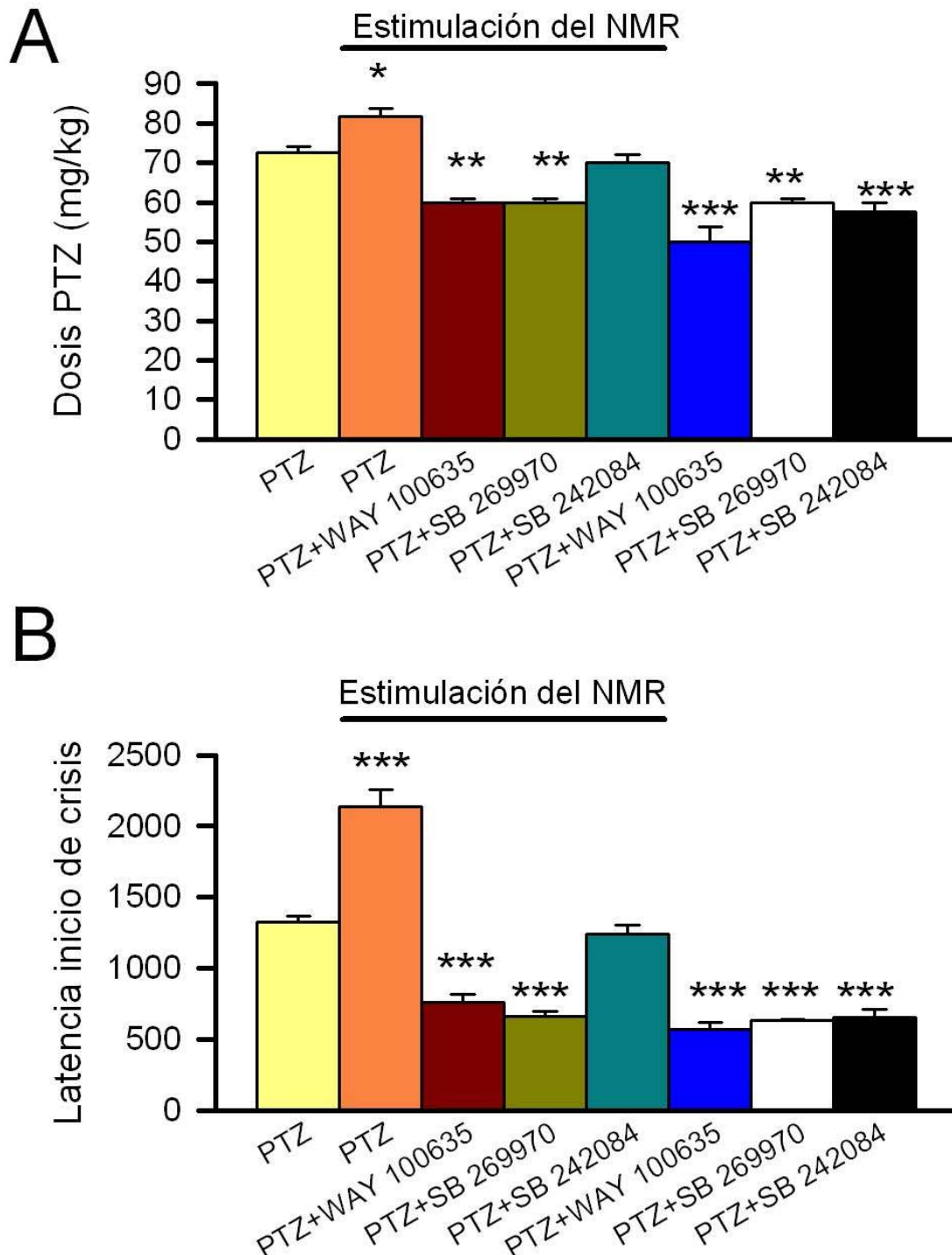


Figura 19. Gráfica de los diferentes grupos experimentales con antagonistas serotoninérgico. (A) Suma acumulada de PTZ antes de generar la primera crisis convulsiva (umbral) en los estadios 4-5. (B) Latencia del inicio de crisis convulsiva (estadio 4-5). Significancia estadística con respecto al control $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***). Datos presentados como valores medios \pm S.E.M.

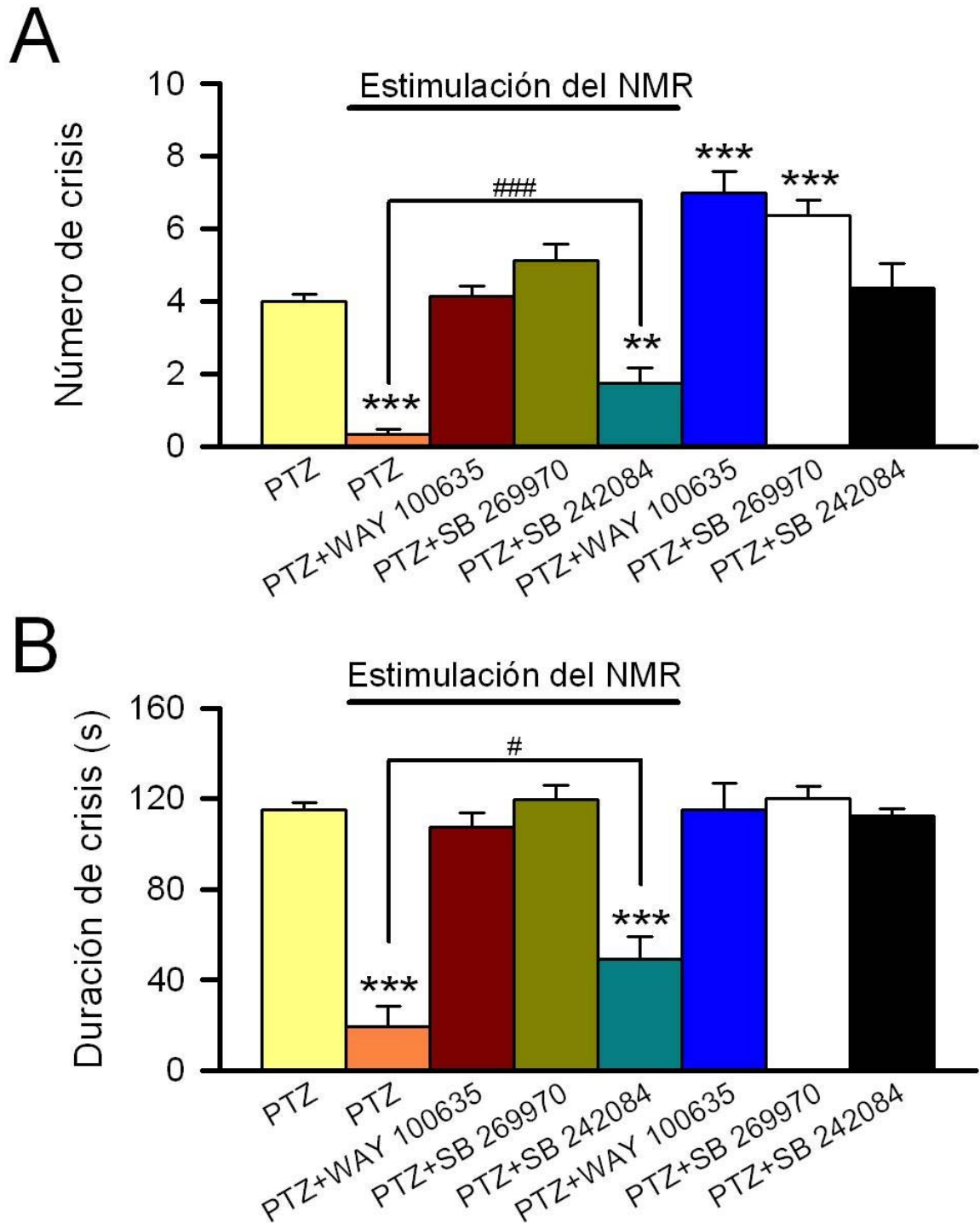


Figura 20. Gráfica de los diferentes grupos experimentales con antagonistas serotoninérgico (A) Valores medios del número de crisis (B) Valores medios de duración de crisis de los diferentes grupos experimentales con antagonistas serotoninérgicos. Significancia estadística con respecto al control $p < 0.05$ (#), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***, ###). Datos presentados como valores medios \pm S.E.M.

Tratamiento del grupo	Número de estímulos
PTZ+NMR Estimulación (12)	16.4 ± 1.6
WAY100635+ Estimulación NMR (8)	57.9 ± 2.0 ***
SB269970+PTZ+Estimulación NMR (8)	68.1 ± 3.9 ***
SB242084+PTZ+Estimulación NMR (8)	32.6 ± 2.7 ***

Tabla 5. Número de estímulos y eventos durante las crisis inducidas con PTZ. Los resultados presentan significancia respecto al grupo control. Datos presentados como medias ± S.E.M. $p < 0.001$ (***).

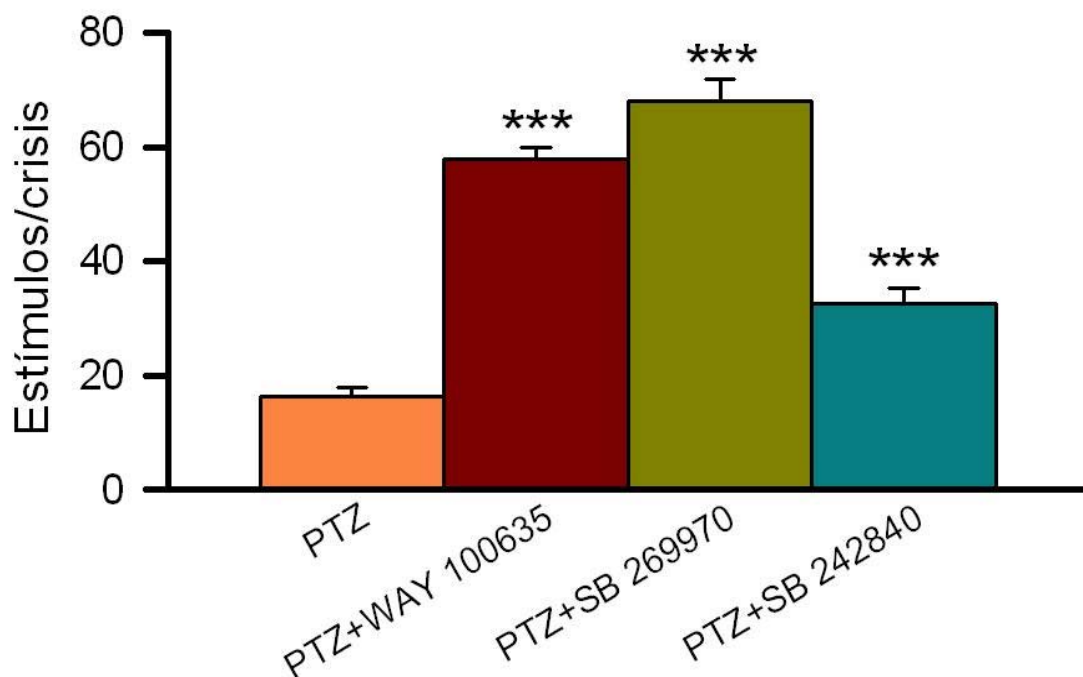


Figura 21. Número medio de estímulos en cada grupo experimentales. (A) Número de estímulos para controlar una crisis inducida con PTZ. Significancia estadística con respecto al control. Datos presentados como valores medios ± S.E.M. $p < 0.001$ (***).

1.4 Efecto de los antagonistas serotoninérgicos administrados mediante microperfusión en crisis convulsivas inducidas con PTZ

Dado que nuestros datos indican que los antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇ aplicados sistémicamente modifican los efectos de la estimulación del NMR en el modelo de epilepsia inducida por PTZ, nos propusimos estudiar sus efectos localmente en el hipocampo mediante microperfusión. Los resultados indican que el WAY100635 (100 µM), antagonista del receptor 5-HT_{1A}, perfundido localmente en la región de CA1 del hipocampo, reduce significativamente tanto el umbral (Fig. 22A; n = 4; p < 0.05) como la latencia al inicio de las crisis convulsivas (Fig. 22B; n = 4; p < 0.001), aumentando, por otro lado, el número de crisis (Fig. 22C; n = 4; p < 0.05) y la duración de las mismas (Fig. 22D; n = 4; p < 0.001) comparado con el grupo control. Además, el 100 % de los animales tenían una crisis convulsiva (estadio 4-5) y requerían una dosis mas baja de PTZ (entre 40-60 mg/kg) para lograrlo. Por otro lado y en concordancia con este antagonista, la perfusión local de SB269970 (1 mM), un antagonista del receptor 5-HT₇, redujo significativamente el umbral (Fig. 22A; n = 4; p < 0.05) y la latencia del inicio de las crisis convulsivas (Fig. 22B; n = 4; p < 0.01), incrementando la duración de las crisis (Fig. 22C; n = 4; p < 0.001) comparado con el grupo control. En el caso de este antagonista, el 100 % de los animales establecían una crisis convulsiva (estadio 4-5) y requerían una dosis mas baja de PTZ (entre 40-60 mg/kg) para alcanzarla. Estos resultados nos indican que la acción de los antagonistas 5-HT_{1A} y 5-HT₇ sobre la estimulación del NMR en el modelo de epilepsia inducido por PTZ se realiza a nivel de las conexiones rafe-hipocampales.

Tratamiento del grupo	Umbral (mg/kg)			
	40	60	70	80
LCR+PTZ (4)	0	0	100	0
LCR+WAY100635+PTZ (4)	25	75	0	0
LCR+SB269970+PTZ (4)	25	75	0	0

Tabla 6. Porcentaje de animales, en diferentes condiciones experimentales, que alcanzan convulsiones tónico-clónicas (Estadios 4 y 5) según la dosis acumulada de PTZ (40- 80 mg / kg). En estos experimentos se perfundieron los antagonistas serotoninérgicos en la región de CA1 del hipocampo a través de una microcánula de diálisis.

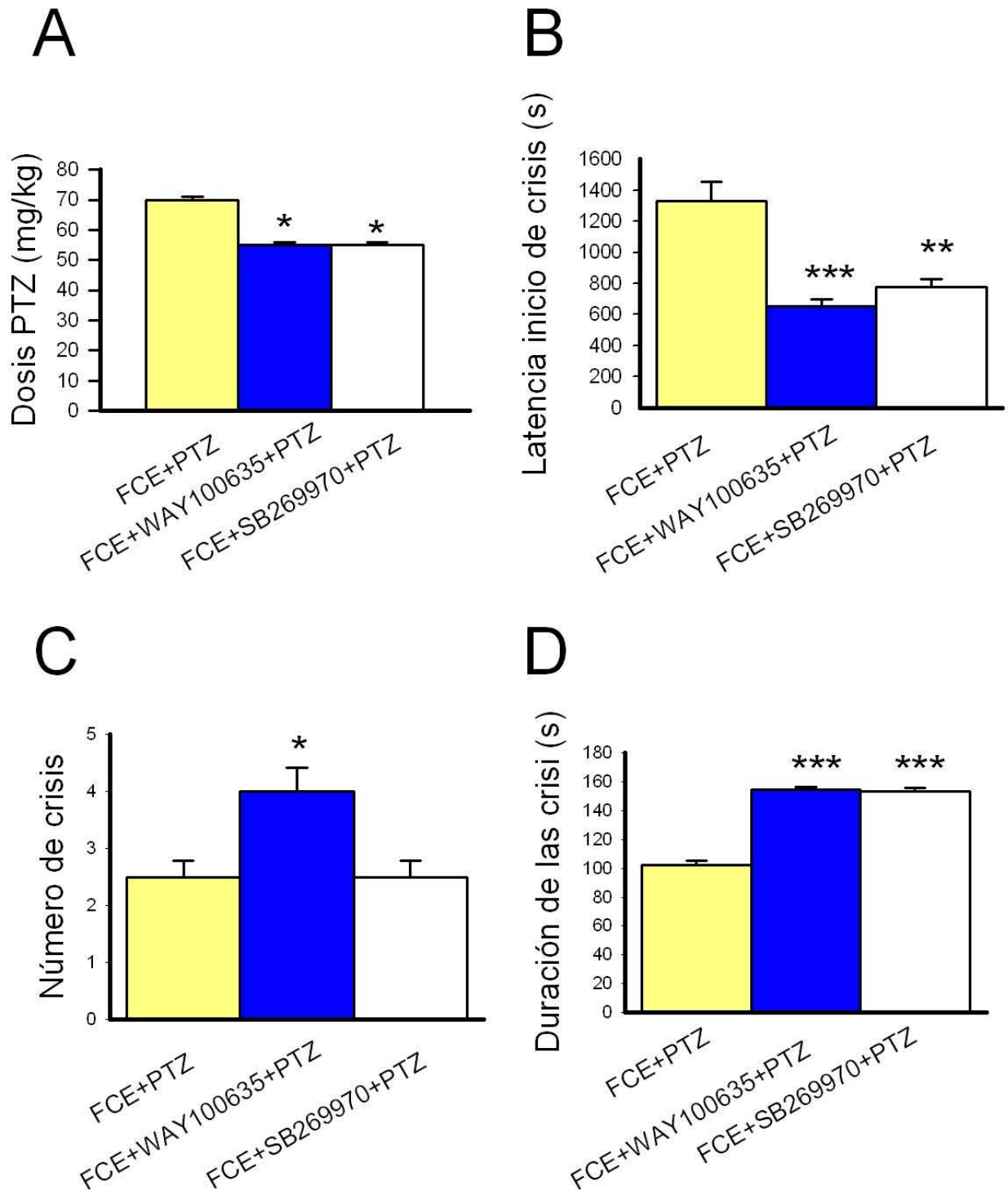


Figura 22. Gráfica de los diferentes grupos experimentales con antagonistas serotoninérgicos administrados mediante microperfusión. (A) Suma acumulada de PTZ antes de generar la primera crisis convulsiva (Umbral) en los estadios 4-5. (B) Latencia de Inicio de crisis convulsiva (estadio 4-5). (C) Número de crisis y (D) Duración de crisis de los diferentes grupos experimentales con antagonistas serotoninérgicos. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***).

**2. ESTUDIO DE MODULACIÓN DE LAS CRISIS EPILÉPTICAS
MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DEL NÚCLEO MEDIAL DEL RAFA
(NMR) EN UN MODELO DE *STATUS EPILEPTICUS* (SE) EN RATAS**

2.1 Análisis electroencefalográfico del SE inducido con pentilentetrazol

Para el análisis de la actividad del EEG tras la administración de PTZ y hasta alcanzar el SE, se empleó una ventana de tiempo de dos horas (120 minutos), la que se iniciaba desde la primera inyección de PTZ (40 mg/kg). Durante este tiempo de adquisición, el fenómeno grafológico del EEG presenta cambios en el trazo similares a los registrados en animales adultos tratados con PTZ, los cuales fueron descritos con anterioridad. Esta característica es importante pues se partió del mismo principio visto en el kindling químico para iniciar la estimulación del Núcleo Medial de Rafe (NMR), es decir, cuando se generaba una onda convulsiva (estadio 2) correlacionada con ondas rítmicas agudas de entre 5-7 Hz.

En estos casos la evaluación comportamental se realizó teniendo en cuenta la escala comportamental empleada por Lamberty (Lamberty y Klitgaard, 2000), añadiendo un estadio más, el estadio seis, el cual indicaba el *Status epilepticus* (SE). Para la determinación del SE se tuvo en cuenta el tiempo (> 5 minutos) durante el cual la rata permaneció en crisis (Lowenstein et al., 1999; Martín et al., 2005). Comportamentalmente, durante el SE, el animal sufre crisis tónico-clónicas con pequeños intervalos de inmovilidad en los que no recupera la postura. Es una crisis severa que involucra todas las extremidades y con una alta tasa de mortalidad en los animales. Los animales control usualmente alcanzaba el SE luego de tener una dosis acumulada de 100 mg/kg de PTZ. Por su parte, el EEG refleja anormalidades en el trazo con ondas complejas y espigas continuas de >30 Hz (Fig. 23).

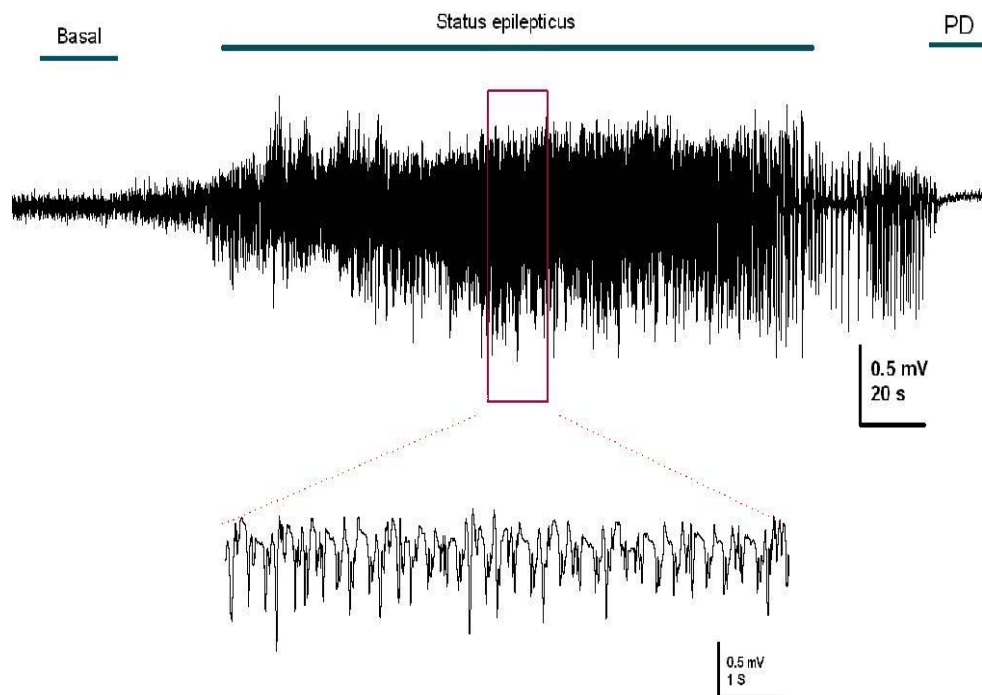


Figura 23. Registro electroencefalográfico durante el SE con espigas continuas y ondas complejas que fluctúan entre los 20-30 Hz. Registro monopolar representativo de la actividad en región CA1 del hipocampo derecho con una dosis acumulada de 100 mg/kg de PTZ en un animal control y posterior depresión post-ictal (PD).

2.2 La estimulación del Núcleo Medial de Rafe elimina el establecimiento del SE inducido por pentilentetrazol

Distintos datos experimentales indican que el PTZ es dependiente de las dosis, así como de la edad de los sujetos de experimentación. De esta manera, en animales inmaduros el kindling con PTZ induce SE (Pereira de Vasconcelos et al, 1995; Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1996; Pineau et al, 1999; Erdogan et al., 2004). Los resultados que se muestran en la grafica (figura 19) señalan el efecto del PTZ acumulado en animales jóvenes antes del establecimiento del SE. La estimulación del NMR en animales jóvenes fue efectiva aumentando significativamente el umbral (Fig. 24A; $n = 4$; $p < 0.05$) y la latencia del inicio de las crisis convulsivas (Fig. 24B; $n = 4$; $p < 0.05$), disminuyendo, por otra parte, el número de crisis (Fig. 24C; $n = 4$; $p < 0.05$) y la duración de las crisis (Fig. 24C; $n = 4$; $p < 0.05$) comparado con el grupo control.

Por otro lado, en el grupo control el 100 % de los animales establecieron un SE al llegar a una dosis acumulada de 100 mg/kg de PTZ, mientras que en el caso de animales estimulados en el NMR recibieron una dosis acumulada máxima de 120 mg/kg de PTZ sin establecer en ningún caso un SE (tabla 7). Otro importante dato radica en la mortalidad que se genera al inducir SE con diferentes modelos, en nuestro caso no es diferente, el SE inducido con PTZ generó una tasa de mortalidad en el 100% de los animales control frente a una mortalidad del 0 % en los animales estimulados en el NMR.

Tratamiento del grupo	Umbral (mg/kg)			
	90	100	110	120
SE(4)	25	75	0	0
SE+Estimulación NMR (5)	0	0	0	0

Tabla 7. Porcentaje de animales, en diferentes condiciones experimentales, que alcanzan un SE luego de la administración de dosis crecientes de PTZ (90-120 mg / kg). Experimentos realizados en animales inmaduros en los que se estimuló el NMR y grupo control.

De esta manera, los resultados confirman que sumado al hecho de que la estimulación del NMR no sólo reduce las crisis convulsivas en animales maduros, sino que evita en un 100 % de los casos el establecimiento de un SE y la muerte del animal pudiendo concluir que la estimulación del NMR es eficaz en controlar un SE en nuestro modelo experimental.

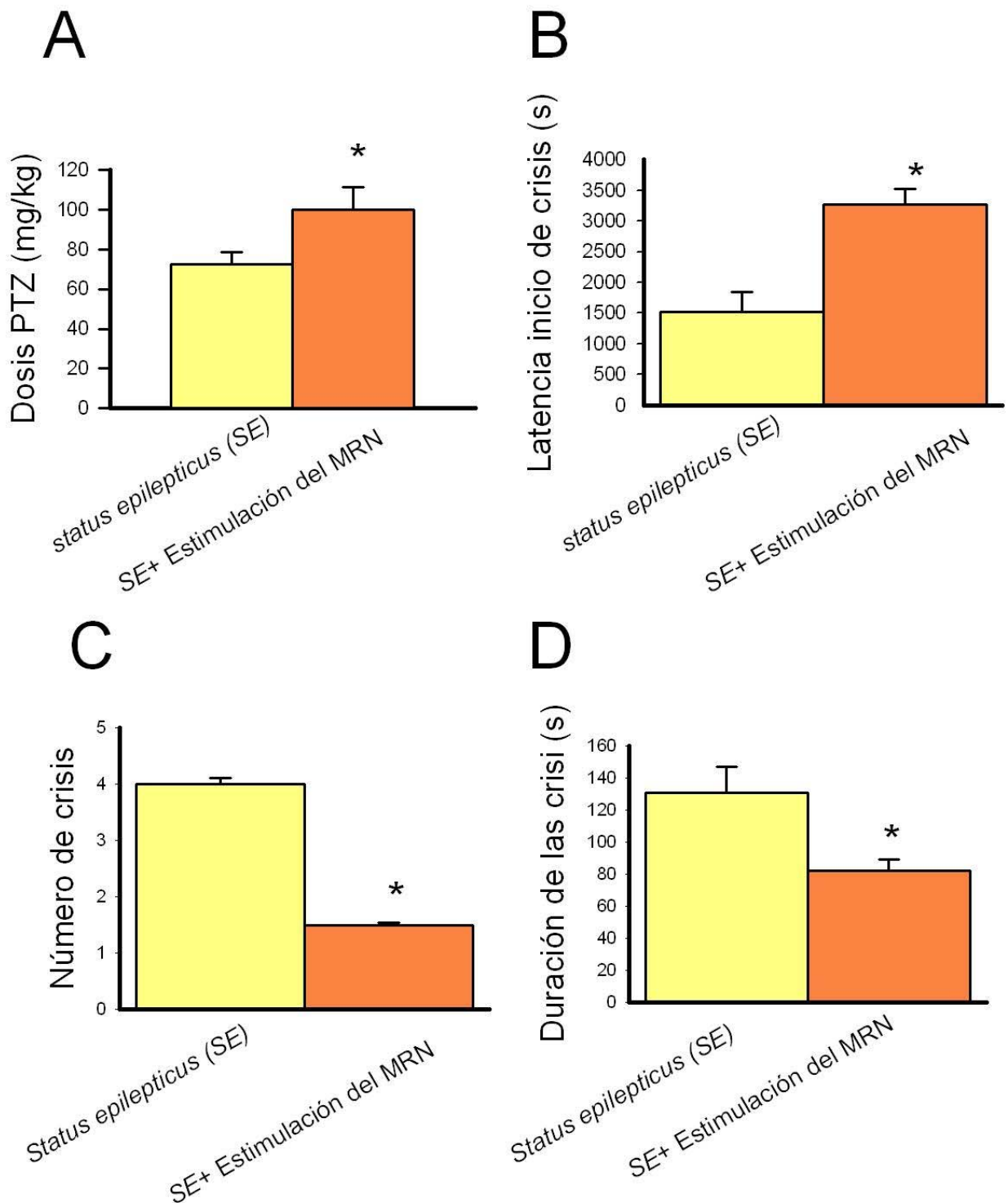


Figura 24. Gráfica de los grupos control y con estimulación del NMR en ratas jóvenes en los que se establecieron un SE. (A) Dosis acumulada de PTZ antes de generar la primera crisis convulsiva en los estadios 4-5. (B) Latencia de Inicio de crisis convulsiva (estadio 4-5). (C) Número de crisis (D) Duración de la crisis en los diferentes grupos experimentales. Datos presentados como valores medios \pm S.E.M. $p < 0.05$ (*).

3. ESTUDIO MEDIANTE TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET) DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS QUE SUCEDEN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN UN MODELO DE EPILEPSIA *IN VIVO* POR LA ADMINISTRACIÓN SISTÉMICA DE PENTILENTETRAZOL (PTZ)

3.1 Estudios de adquisición estáticos de PET durante la actividad metabólica intercrítica

En los estudios estáticos, en los que se realizó el protocolo de inyecciones consecutivas de dosis subconvulsivas de PTZ, pudimos observar una disminución generalizada de la captación de la ^{18}F -FDG en el cerebro (Fig. 25).

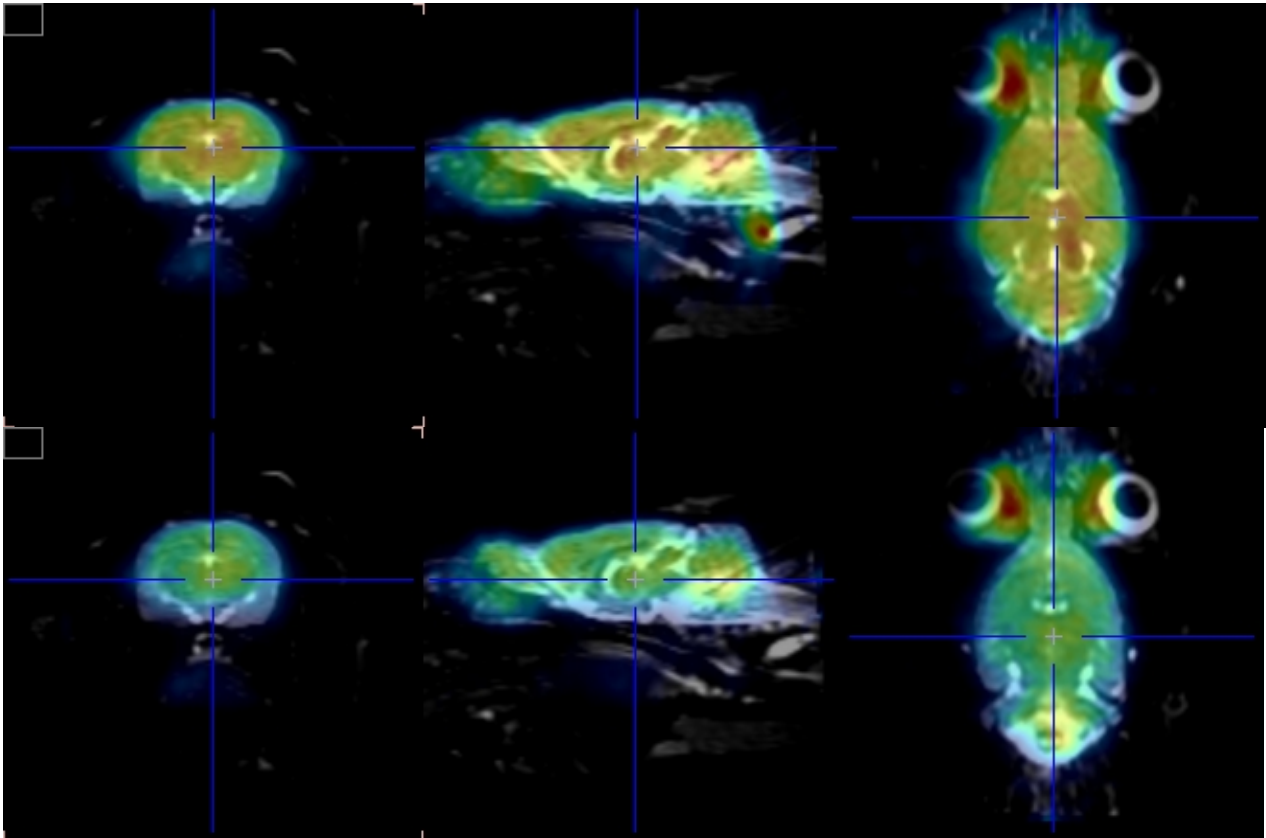


Figura 25. Imágenes por PET de un mismo individuo en situación basal (arriba) y tras la administración de pentilentetrazol (abajo) correlacionadas con la Resonancia Magnética (RM) del mismo animal. Podemos observar como en situaciones basales hay una mayor captación de FDG que luego del tratamiento con PTZ. Esta disminución del metabolismo se observa de forma generalizada en todas las estructuras del cerebro de la rata.

Como se puede apreciar en la gráfica de la figura 26, esta disminución se produce en todas las regiones estudiadas y su magnitud oscila entre un 20 y un 30 %. Sin embargo, el descenso del metabolismo fue mas significativo en aquellas estructuras cerebrales (tálamo, hipocampo y estriado) relacionadas con la epilepsia (Fig. 27; $n = 10$; $p < 0.01$).

Como hemos demostrado, tras la crisis tónico-clónica ocurre una fase denominada depresión post-ictal en la que el animal no da indicios de movimiento espontáneo y el EEG muestra un registro plano (Fig. 28). Este tipo de trazo puede extenderse por varios minutos antes de la recuperación del trazado EEG basal, coincidiendo con el momento en el que se realizó el PET y la reducción de la actividad metabólica observada.

De esta manera, los resultados indican que hay una disminución del metabolismo generalizada en todas las estructuras cerebrales tras la crisis epiléptica inducida por PTZ.

Mecanismo de control de las crisis temporales en un modelo de kindling químico

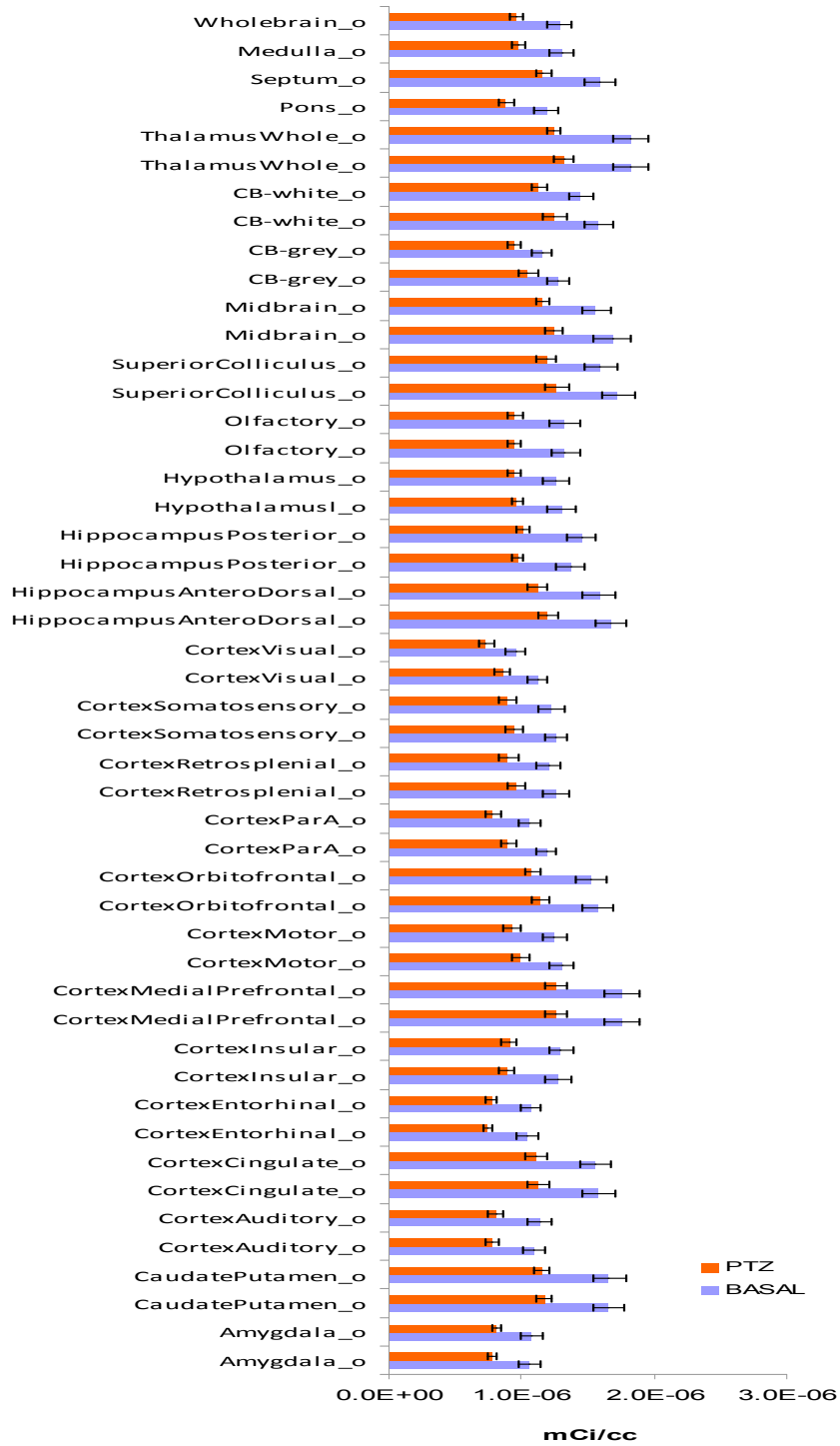


Figura 26. Representación en un gráfico de barras del promedio de captación de FDG en mCi/cc de las diferentes estructuras analizadas del cerebro en cada grupo experimental. En azul, el grupo basal, tratado únicamente con salino. En naranja, el tratado con pentilentetrazol (PTZ). Las barras de error se corresponden con el error estándar para cada estructura. Se aprecia claramente la mayor captación de FDG en todas las estructuras en los individuos del grupo basal respecto a la del grupo PTZ.

Mecanismo de control de las crisis temporales en un modelo de kindling químico

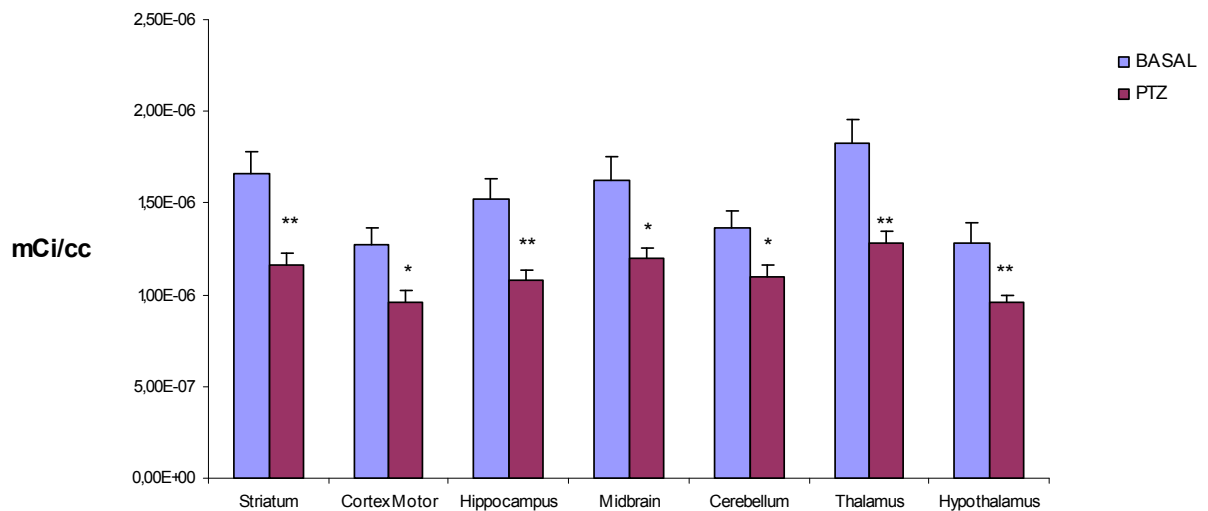


Figura 27. Representación en un gráfico de barras que muestra la disminución de glucosa cerebral en las estructuras cerebrales relacionadas con las crisis inducidas con PTZ. Datos presentados como los valores medios \pm S.E.M. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

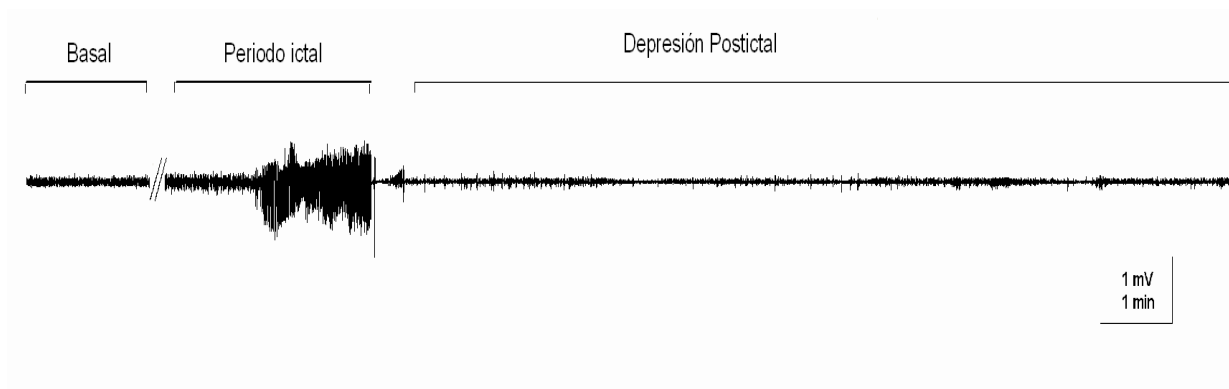


Figura 28. Registro electroencefalográfico en región CA1 de hipocampo tras una crisis inducida con 70 mg/kg de PTZ. En él podemos observar el aumento de descargas durante el periodo ictal (2 minutos) y la posterior reducción de actividad tras el periodo crítico (depresión post ictal) el cual puede llegar a durar varios minutos.

3.2 Estudios de adquisición dinámicos de PET durante la actividad metabólica en el periodo crítico

Para analizar los datos obtenidos de los estudios dinámicos, en los que únicamente se aplicó una dosis convulsiva de PTZ, obtuvimos las constantes

cinéticas de cada estudio para posteriormente obtener un promedio de cada grupo, con y sin PTZ. Para este estudio, comparamos la constante K_i ; que es una constante que representa el flujo total de la FDG hacia el interior de la célula (Castell y Cook, 2008) (Ver 2.2.2, esquema 1), la que se obtiene de la curva de incorporación de ^{18}F -FDG.

En contraste con los resultados obtenidos de los estudios estáticos, en el grupo al que se le administró PTZ (70 mg/kg) en una sola dosis, se observó un aumento de la velocidad de captación de glucosa. Como se puede ver en la gráfica (Fig. 29) la incorporación de FDG es mucho más rápida cuando se le provoca la crisis con PTZ que en las condiciones basales. La variación de K_i fue de un aumento de un 70% respecto a los valores basales en la actividad total del cerebro (Fig. 30). Sin embargo, en estos experimentos se observó una variabilidad mayor entre diferentes estructuras que en los estudios estáticos.

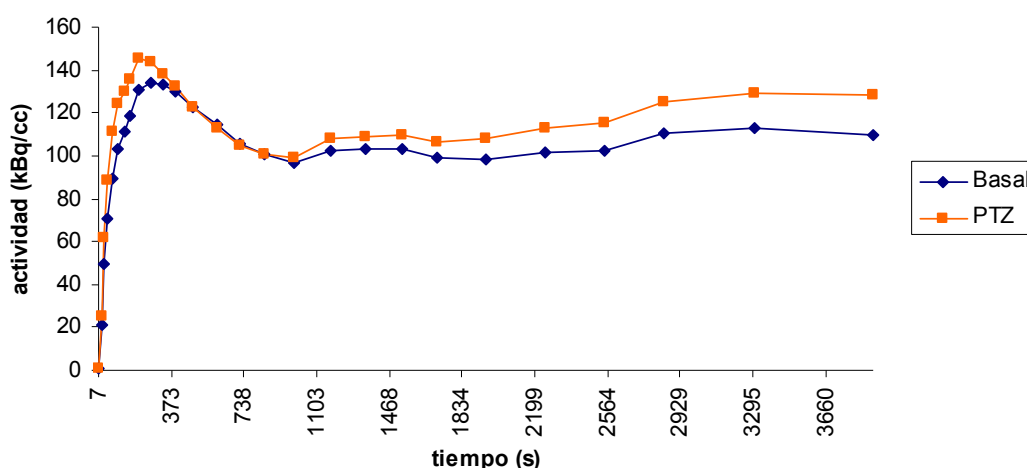


Figura 29. Gráfica de incorporación de FDG en un mismo animal. En azul el estudio control con salino, en naranja el estudio posterior a la aplicación de PTZ. Se observa claramente como en el estudio con PTZ alcanza el máximo en un tiempo menor (210 s) que el basal (270 s).

Posteriormente, analizamos estos estudios como estáticos, haciendo un promedio de todos los frames adquiridos. En este segundo análisis se obtuvo también un aumento de la captación de ^{18}F -FDG en el grupo tratado con PTZ. Sin embargo, al realizar el promedio, la diferencia entre ambos grupos se redujo sensiblemente comparada con el análisis dinámico, de tal modo que se perdió la significación estadística entre ambos grupos (Fig. 31).

Mecanismo de control de las crisis temporales en un modelo de kindling químico

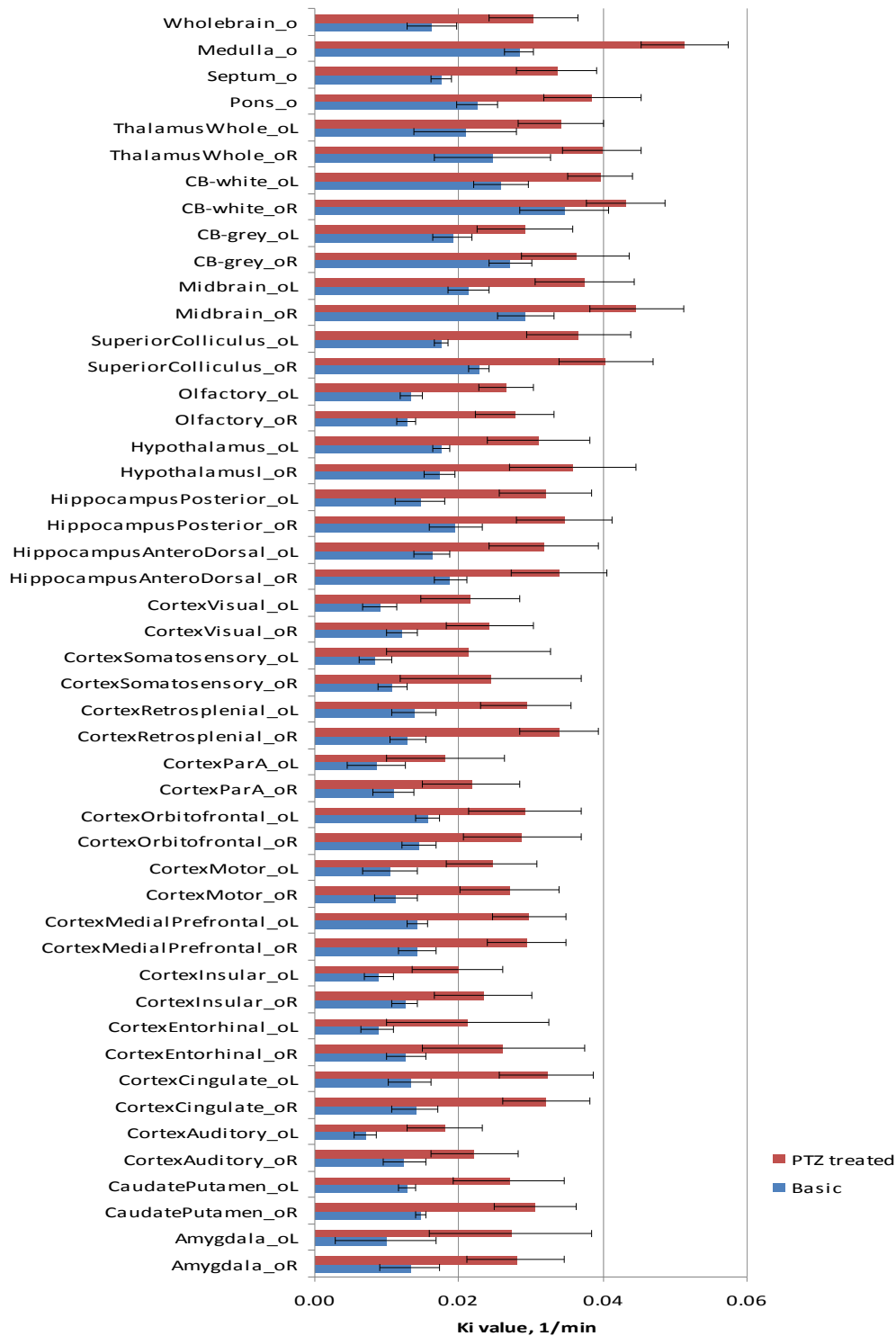


Figura 30. Representación en un gráfico de barras del promedio de la constante Ki en unidades 1/min de las diferentes estructuras analizadas del cerebro en cada grupo experimental. En azul el grupo basal, tratado únicamente con salino y en rojo el grupo PTZ tratado con pentilentetrazol. Las barras de error se corresponden con el error estándar para cada estructura. Se aprecia claramente la mayor velocidad de captación de FDG en todas las estructuras en los individuos del grupo tratado con PTZ respecto a sus condiciones basales.

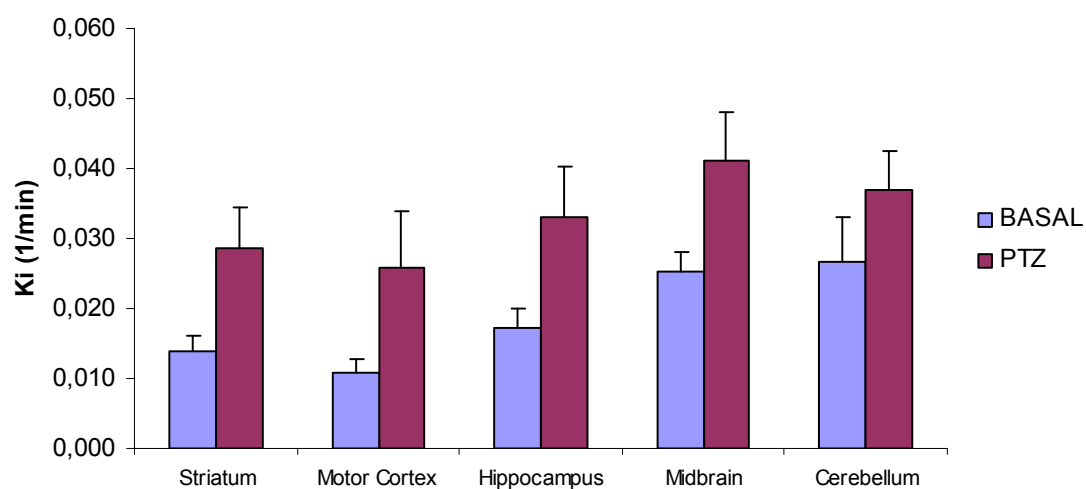


Figura 31. Gráfica de barras de la constante Ki media por grupo experimental de las estructuras con mayor diferencia entre los dos tratamientos. En este caso, se aprecia una mayor velocidad de captación de FDG en el grupo tratado con PTZ. De igual forma que en el estudio estático, las estructuras en las que mayores diferencias se observan son el estriado, el hipocampo y el tálamo.

**4. ESTUDIO DE FIJACIÓN DE RADIOLIGANDOS MEDIANTE
AUTORRADIOGRAFÍA EN ANIMALES TRATADOS CON
PENTILENTETRAZOL (PTZ)**

4.1 Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con ^{18}F MPPF

La autorradiografía es una técnica de fijación con radioligandos que permite la visualización de receptores celulares en secciones de tejido. Esta técnica, permite determinar la distribución de los receptores endógenos mediante la fijación de ligandos radiactivos y cuantificar su presencia en distintas estructuras cerebrales. Por consiguiente, teniendo en cuenta esta condición, los cerebros de los animales control, tratado con PTZ con y sin estimulación, así como animales sin PTZ pero estimulados, fueron incubados con un radiotrazador específico del $5\text{-HT}_{1\text{A}}$, el ^{18}F MPPF (Aznavour y Zimmer, 2007) a fin de determinar si el PTZ y la estimulación de NMR modificaban la densidad de receptores en los diferentes grupos experimentales.

Cabría esperar una disminución en la densidad de receptores en los que se fija el ^{18}F -MPPF en el grupo en los que se estimuló el NMR si se compara con el control, teniendo en cuenta que la liberación de serotonina por la estimulación del NMR no se podría fijar al receptor al estar éste ocupado. Así mismo, se esperaría que esta reducción tuviera su máxima expresión en regiones donde el receptor $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ se expresa en una alta densidad, como CA1 del hipocampo (Fig. 32AB), septum, amígdala, núcleo del rafe y la corteza entorrinal, núcleo medial y dorsal del rafe (Fig. 32CD) (Marcinkiewicz et al., 1984; Albert et al., 1990; Miquel et al., 1991; Pompeiano., 1992; Hoyer et al., 1997; Plénevaux et al., 2000, Aznavour et al., 2006_{a,b}). Sin embargo, la autorradiografía realizada en los grupos experimentales con $[^{18}\text{F}]$ -MPPF no evidenció ninguna diferencia significativa entre los diferentes grupos experimentales.

Estos resultados indican que en los grupos experimentales en los cuales se incubó un radiotrazador específico del $5\text{-HT}_{1\text{A}}$, el ^{18}F MPPF, no se observó fijación del radioligando ^{18}F -MPPF, posiblemente debido al modelo agudo a cual los animales fueron sometidos con PTZ, así como posiblemente a la baja intensidad del estímulo al cual fue sometido el animal, lo que no permitió al ^{18}F -MPPF fijarse al receptor de serotonina. Así mismo, cabe rechazar la idea de que la no fijación se deba posiblemente a muerte neuronal, teniendo en cuenta que el modelo de kindling químico con PTZ no la genera (Pineau et al., 1998), en un

estudio con ácido kaínico se observó una reducción de la fijación del ^{18}F MPPF como consecuencia de la muerte neuronal inducida por el SE (Van Bogaert et al., 2001). Cabría suponer que si el modelo de PTZ hubiera sido crónico, así como si el estímulo fuese más fuerte y de mayor duración como en anteriores estudios de estimulación del NMR (Kovacs & Zoll, 1974; Perryman et al., 1980; Nishi et al. 1980), posiblemente se podrían haber fijado estructuras que están implicadas en crisis inducidas por PTZ.

4.2 Fijación de radioligandos mediante autorradiografía con ^{18}F MPPF y ^{18}F -FDG

La autorradiografía *ex vivo* con ^{18}F -FDG en una rata a la que se aplicó PTZ (1 mg/5 μl) intrahipocámpalmente en CA1 pero no fue estimulada en el NMR, evidenció un aumento en la incorporación del ^{18}F -FDG en un 10 % en el hipocampo y un aumento de incorporación del 25 % en la región de CA1 comparados con el hemisferio contralateral (Fig. 33A). Así mismo, en cortes del mismo animal (hipocampo y NMR) a los cuales se le realizó posteriormente autorradiografía con [^{18}F] MPPF se observó una disminución en la densidad de receptores de $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ en los cuales se fijó el [^{18}F] MPPF (Fig. 33B).

El tratamiento de PTZ suministrado localmente en hipocampo en animales *ex vivo* y posterior autorradiografía señalan un notable aumento de la captación de ^{18}F -FDG y aún más interesante, se observa una notable disminución de fijación de ^{18}F -MPPF en área de alta densidad de este receptor de serotonina (Marcinkiewicz et al., 1984; Albert et al., 1990; Miquel et al., 1991; Pompeiano., 1992; Hoyer et al., 1997; Plénevaux et al., 2000, Aznavour et al., 2006a,b) el cual además se correlaciona con el lugar de aumento de captación de ^{18}F -FDG. Consolidaría nuestros datos al indicar que el receptor de $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ está implicado en la modulación de las crisis convulsivas, al confirmar experimentalmente la participación de la serotonina en la modulación de las crisis experimentales, posiblemente como una forma de modular las crisis se ha liberado serotonina a fin de contrarrestar las crisis inducidas por el PTZ.

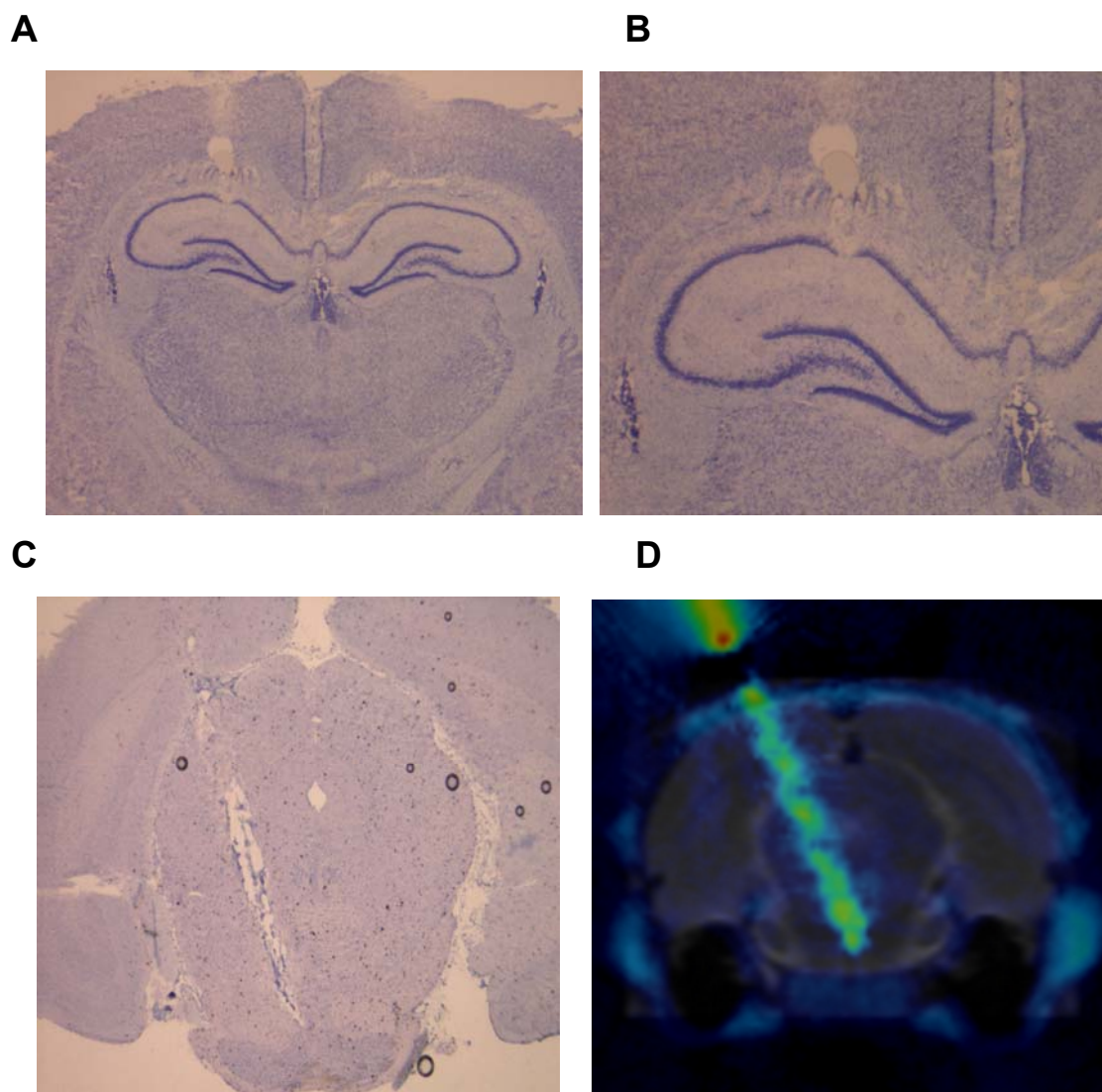


Figura 32. Estructuras anatómicas de registro y estimulación del NMR. (A) Vista panorámica de los hipocámpos dorsales (B) Vista ampliada de CA1 de hipocampo izquierdo en donde se ubicaban los electrodos de registro. C. Implantación de electrodo de registro. A-B-C Realizados con tinción de Nissl. D. Imagen TAC corregistada a la resonancia del mismo animal permite observar la ubicación del electrodo de estimulación en ángulo de 20° en el NMR (imagen obtenida por el Tomógrafo Albira PET de Onco Vision).

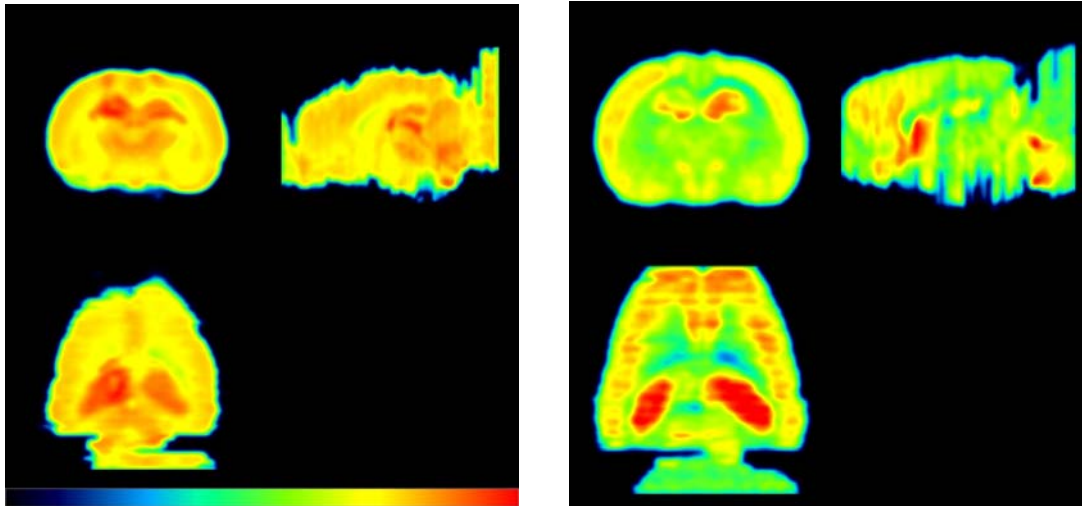


Figura 33. Imagen autorradiográfica de una rata ex vivo en una escala de frío. (A) Imagen por autorradiografía realizada con el radiotrazador ^{18}F -FDG. (B) Imagen por autorradiografía realizada con radiotrazador $[^{18}\text{F}]$ MPPF (nótese el aumento de actividad metabólica en hipocampo dorsal con el ^{18}F -FDG (A) y la correspondencia anatómica, con la disminución de fijación de $[^{18}\text{F}]$ MPPF en las zonas de alta densidad de receptores de 5-HT_{1A}).

V. DISCUSIÓN

El modelo de kindling químico inducido por pentilentetrazol (PTZ)

El modelo de epilepsia inducido químicamente mediante el kindling con PTZ es uno de los modelos de epilepsia más aceptados y reproducidos en diferentes laboratorios y especies. El PTZ es un potente antagonista GABA_A (Park et al., 2006) reconocido clásicamente como un modelo de epilepsia generalizada (Ono et al., 1990) con una alta preferencia por crisis que involucran estructuras temporales (Erdtmann-Vourliotis et al., 1998; Szyndler et al., 2010). Además se sabe que el PTZ atraviesa la barrera hematoencefálica con facilidad (Padou et al., 1995), no genera muerte neuronal (Pineau et al., 1999), tiene una dosis-respuesta fácilmente identificable (Gilber y Goodman, 2006) y una respuesta comportamental y electroencefalográfica característica (Ono et al., 1990), así como una baja mortalidad (Zhao, 2006). Por otro lado, hasta la fecha los mecanismos por los cuales se establecen las crisis inducidas por PTZ, aun están por ser determinados (Engel y Philip, 2006). Es conocido que los fármacos antiepilépticos tienen dos patrones de acción, por un lado el incremento de la inhibición a través de GABA o glicina y por otro la reducción de la excitación debido al glutamato. De esta manera es conocido que anticonvulsivantes como las benzodiazepinas, barbitúricos, vigabatrina, tiagabina, o progabide actúan a través de vías GABAérgicas (Pranzatelli y Nadi, 1995).

Conociendo las ventajas que el modelo de PTZ nos ofrece, establecimos que el modelo de kindling con PTZ sería el mejor modelo para estudiar el papel de las vías serotoninérgicas en la epilepsia, básicamente por las siguientes razones: 1, es un modelo que presenta un comportamiento de crisis muy característico que permite una fácil observación y evaluación; 2, es un modelo de crisis hipocampal muy estudiado y estandarizado; 3, presenta similitudes con la epilepsia del lóbulo temporal en humanos, lo que desde el punto de vista experimental es de gran relevancia y 4, tiene una baja mortalidad asociada a las crisis (Zhao, 2006).

El concepto de kindling fue dado a conocer por Goddard, quien popularizó el termino en 1967 con los primeros estudios con el kindling eléctrico (Goddard, 1967). Si bien cuando usualmente se hace referencia al kindling suele ser al kindling eléctrico, el termino kindling implica un incremento progresivo de la

respuesta comportamental y EEG ante un estímulo, ya sea químico o eléctrico (Morimoto, 2004). Son varios los protocolos de kindling con PTZ que se han empleado con anterioridad, sin embargo, el protocolo más usual es el empleado en la presente tesis, en el que dosis subumbrales de PTZ se suministra en varias dosis en un solo día. Otros protocolos, por su parte, conllevan inyecciones subumbrales o umbrales de PTZ por días incluso semanas hasta alcanzar el estadio cinco y una respuesta EEG de crisis tónico-clónica (Ono. et al., 1990). Así mismo, durante el establecimiento de las crisis el EEG presenta cambios en el trazo relacionados con cambios comportamentales, estos incluyen: inmovilidad, tirones mioclónicos (posición de canguro), crisis clónicas y tónico-clónicas (Velíšek, 2006). Ahora bien, aunque para los análisis solo se tuvo en cuenta los estadios comportamentales 4-5, así como aquellos grafoelementos que estuvieran en el rango de frecuencia de la banda gamma (30 Hz) para reducir fuentes de ruido por movimiento u otros artefactos y mejorar su relación señal-ruido, realizamos un análisis correlacionando EEG y comportamiento.

Durante los estadios 0 y 1 respectivamente, el EEG presentó una línea base normal con ocasionales ondas rítmicas agudas de entre 4-5 Hz que sucedían usualmente cuando aparecían contracciones de la cabeza en el estadio 1. Por su parte, durante el estadio 2 el animal presenta ondas convulsivas a través del cuerpo (espasmos), que se observan como contracciones musculares transitorias en todas las extremidades del cuerpo y que comportamentalmente aparecían como pequeños saltos hacia atrás. Este tipo de crisis es fácil de reconocer y puntuar, siendo una de las características más frecuentes durante las crisis inducidas por el PTZ y ausentes en otros modelos (Luttjohann et al., 2009). Además, el estadio dos era importante para nuestro trabajo experimental al ser el indicador del inicio de la estimulación del NMR. Este tipo de espasmos en algunas oportunidades también se presentaba acompañado con o sin movimientos estereotipados de la cabeza. Por su parte, el EEG característico de este tipo de estadio era múltiples espigas de entre 5-7 Hz, aunque también podían observarse espigas solitarias visibles en el trazo.

En la actualidad, muchos investigadores continúan empleando la escala de Racine como herramienta para la valoración de cualquier modelo de epilepsia

animal, entre ellos el de PTZ. Sin embargo, la escala de Racine no contempla algunos estadios que el modelo de kindling con PTZ tiene. Por ejemplo, se ha visto que el modelo de kindling eléctrico del hipocampo desarrolla el estadio cinco (crisis tónico-clónicas generalizadas) sin la presencia de los estadios uno y dos de las crisis inducidas por PTZ (espasmos). Estos estadios durante el kindling eléctrico son remplazados por la expresión de “wet-dog shakes” que se traduce como sacudidas de perro (McIntyre et al., 2002; Luttjohann et al., 2009). Por otro lado, se conoce que el kindling de la corteza perirrinal expresa rápidamente los estadios 3-5 de la escala de Racine, mientras que los estadios uno y dos (movimientos faciales y cabeceado respectivamente) se presentan posteriormente (McIntyre et al., 2002). Así mismo, nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros autores quienes estudiaron la correlación entre el trazo del EEG y el comportamiento observado durante el desarrollo de las crisis inducidas con PTZ (Ono et al., 1990; Bachiega et al., 2008; Luttjohann et al., 2009).

Durante el estadio 3 el animal presenta sacudidas mioclónicas en las extremidades anteriores y postura de canguro y su EEG muestra espigas continuas y ondas complejas de gran amplitud que fluctúan entre los 10-12 Hz. La postura de canguro es definida como una postura en la que el animal se pone de pie con el apoyo de las extremidades posteriores y la cola. Esta postura está acompañada, usualmente, de convulsiones clónicas de las extremidades anteriores y la boca y, en algunas ocasiones, conlleva a la pérdida del equilibrio y caída del animal para posteriormente desarrollar una crisis tónico-clónica (Ono et al., 1990). El tiempo que transcurre entre el estadio tres y los estadios cuatro y cinco para el establecimiento de las crisis es variable e impredecible. En cuanto a la posición de canguro es un estadio que solo se ha reportado durante las crisis inducidas con PTZ y no durante crisis inducidas por kindling eléctrico (Luttjohann et al., 2009; Ono et al., 1990).

Por su parte el estadio 4-5 se caracteriza porque el animal ha progresado a convulsiones clónicas en todas las extremidades y el EEG refleja anomalías en el trazo con ondas complejas y espigas continuas que fluctúan entre los 20-30 Hz. Durante este estadio, que es la mayor expresión de las crisis convulsivas

inducidas con PTZ en animales maduros, esta comprometido en tronco encefálico (Velíšková, 2006). Este estadio convulsivo se presenta igualmente en otros modelos entre los cuales esta el kindling eléctrico. Por otro lado, igual que en los estadio uno y dos, nuestros resultados tanto electroencefalográficos como comportamentales en el estadio cuatro y cinco, están en acuerdo a las observaciones realizadas por otros autores durante las crisis inducidas con PTZ (Schickerová et al., 1984; Ono. et al., 1990; Luttjohann et al., 2009).

Al finalizar el estadio 4-5 de convulsiones tónico-clónicas, pudimos observar que el animal presenta un estado denominado depresión post-ictal en el que el sujeto no presenta ningún movimiento espontáneo y el EEG muestra un trazado de muy baja amplitud, algo otros autores habían descrito con anterioridad (Schickerová et al., 1984; Luttjohann, et al. 2009).

Por último, durante el SE generado por el PTZ en animales jóvenes, el EEG presenta continua espigas y ondas complejas que fluctúan entre los 20-30 Hz y con una duración mayor 5 minutos, lo que define el SE (Hellier et al., 1998; Glien et al., 2001; Martín et al., 2005), y en donde sucede la muerte del animal (Martín et al., 2005) si no se emplean fármacos adecuados (Mazarati et al., 1988; Treiman, 1989). En nuestro caso esta situación no fue diferente y los animales que alcanzaron el SE murieron durante las crisis.

La estimulación eléctrica del Núcleo Medial del Rafe modula crisis generadas con PTZ

En la actualidad se sabe que el 25 % de los pacientes epilépticos no responden a los fármacos anticonvulsivante (Durand, 2009) y que la estimulación eléctrica podría ser una nueva y prometedora alternativa para el tratamiento de las epilepsias intratables (Boon et al., 2009). La estimulación eléctrica cerebral ha sido empleada anteriormente como alternativa terapéutica en la epilepsia, así como en distintas situaciones patológicas entre las que se encuentra la enfermedad de Parkinson, el dolor y desórdenes obsesivos-compulsivos (Ngyuen et al., 2000; Nuttin et al., 1999; Pollak et al., 2002). En la epilepsia se han realizado experimentos empleando dos tipos de estímulos. Por un lado,

estímulos eléctricos de baja frecuencia (LFS del inglés *Low frequency electrical stimulation*) *in vivo* e *in vitro* en donde se reduce tanto la excitabilidad neuronal como la actividad convulsiva y, por otro lado, estímulos de alta frecuencia conocidas como estimulación cerebral profunda (DBS, del inglés, Deep Brain Stimulation) a fin de modular crisis convulsivas (Durand, 2009).

En el caso de la DBS se han estimulado estructuras que se consideran juegan un rol importante en el disparo de la red epileptogénica, como es el caso del núcleo anterior del tálamo, el tálamo, el núcleo caudado, el cerebelo, el hipocampo y la amígdala basolateral (Cooper y Upton., 1978; Iadarola y Gale, 1982; Fisher et al., 1992; Chkhenkeli y Chkhenkeli 1997; Velasco et al., 2000; Chabardes et al., 2002; Hodaie et al., 2002; Goodman., 2005; Lee et al., 2006; Lim et al., 2007; Osorio et al., 2007; Fisher et al., 2010), así como la estimulación de nervios periféricos como es el caso del nervio vago (Ben-menachenm et al., 1994; Ramsay et al., 1994; DeGiorgio et al., 2000; De-Herdt et al., 2007). Actualmente, la estimulación del nervio vago es, sin duda, la más utilizada. Un ejemplo de ello son los cerca de 10.000 pacientes al año con implantes para el tratamiento de la epilepsia (Durand, 2009). Los estudios indican una efectividad en el control de las crisis que se encuentra entre el 24 y el 50 % en la reducción de las mismas (Holder et al., 1992; Uthman et al., 1993; Ben-Menachem et al., 1994; Ramsay et al., 1994; Handforth et al., 1998; The Vagus Nerve Stimulation Study Group, 1995; Lee et al., 2006; Lim et al., 2007; Osorio et al., 2007). Sin embargo, pese a todo lo anterior, el mecanismo exacto de cómo actúa la estimulación sobre la modulación de las crisis convulsivas, así como los parámetros de estimulación y estructuras diana para estimular continúan aún sin ser establecidos. Se ha postulado que campos eléctricos y estimulación eléctrica aplicada directamente sobre el cerebro pueden generar hípervolarización en la membrana incrementando el umbral de la descarga neuronal, sin embargo esto aún no se ha esclarecido totalmente (Durand, 2009). Esta opción terapéutica no está exenta de efectos secundarios producto de la estimulación eléctrica. En el caso del nervio vago se encuentran, ronquera, tos, dolor cervical, disfonía y alteración del tono de voz que suelen mantenerse en los periodos de estimulación (García-March et al., 2008). En el caso de la estimulación de los

núcleos subtalámicos se observa reducción de la memoria o trastornos psiquiátricos en el 18.8 % de los pacientes implantados (Hariz et al., 2008).

La evidencia experimental en modelos animales de epilepsia han señalado que la serotonina y específicamente los receptores subtipo 5-HT_{1A}, (Gariboldi et al., 1996; Lopez-Meraz et al., 2005), 5HT₇ (Peričić y Švob Štrac, 2007) y 5HT_{2c} (Tecott et al., 1995; Upton et al., 1998) juegan un papel importante en la modulación de las crisis convulsivas (Gariboldi et al., 1996; Bagdy et al., 2007). Igualmente, con anterioridad se conocía que la estimulación del NMR generaba un incremento en la liberación del 5-HT en varias partes del cerebro (Eccleston et al., 1970; Sheard y Zolovick, 1971; Shields y Eccleston, 1972). Teniendo en cuenta que experimentalmente se ha demostrado que la estimulación eléctrica y que diferentes receptores de serotonina modulan las crisis convulsivas en diferentes modelos experimentales, se hipotetizó que la estimulación eléctrica en el Núcleo Medial del Rafe (NMR), un importante centro de liberación de serotonina con proyecciones al prosencéfalo, incluido la formación hipocampal (Conrad et al., 1974; Mokler et al., 1998), podría controlar las crisis convulsivas hipocampales inducidas por PTZ.

Estudios previos de estimulación eléctrica del NMR habían explorado el control de las crisis convulsivas empleado diferentes modelos experimentales de epilepsia así como diferentes protocolos de estimulación, con variados resultados (Kovacs y Zoll, 1974; Perryman et al., 1980; Nishi et al. 1980). En el estudio realizado por Kovacs y Zoll en ratas, antes de la inyección i.p. de PTZ se estimulaba eléctricamente el NMR una hora con pulsos de 1 ms de duración, 8-10 Hz, a una intensidad de 0.2-0.24 mA. El estímulo se mantenía durante cuatro minutos tras la inyección del proconvulsivante (tabla 8). Este protocolo fue efectivo en reducir la severidad de las crisis inducidas por PTZ (Kovacs & Zoll, 1974). Por su parte, en un estudio encabezado por Nishi, se demostró que estimulación del NMR (pulsos de 0.2 msec, 10 Hz, con una intensidad de 2.0 a 4.0 V) en conejos era capaz de inhibir las crisis inducidas por la inyección de carbacol en el hipocampo dorsal. En este caso, la estimulación se aplicó durante una hora antes de la inyección intrahipocámpica y se mantuvo durante cinco minutos tras la aplicación de la misma (tabla 8; Nishi et al., 1980). Sin embargo,

en ambos estudios el protocolo de estimulación fue efectivo solo para bloquear la generación de las crisis experimentales pero no cuando las crisis ya estaban establecidas, un hecho observado en otros estudios experimentales (Woodbury and Woodbury, 1990). Por último, Perryman y colaboradores observaron que estimulación eléctrica del NMR durante 24 horas a 0.1 ms, 10 Hz, 1 mA, durante diez minutos alternados con periodos de diez minutos sin estimulación, en dos monos con crisis psicomotoras crónicas inducidas por hidróxido de aluminio (tabla 8), reducía el promedio de crisis diarias en uno de los dos animales pero con una significativa muerte neuronal en ambos (Perryman et al., 1980). Actualmente, existe suficiente evidencia experimental que demuestra que la estimulación continua (por ejemplo, una hora) genera daño neuronal, mientras que la estimulación intermitente no produce estos efectos (Agnew et al., 1989; Agnew and McCreery, 1990; Ramsay et al., 1994). Se conoce, igualmente, que la estimulación sostenida del NMR durante 20 minutos a 20 Hz en ratas concientes reduce en un gran porcentaje la liberación de serotonina (Mokler et al., 1998), lo que nos indica que, en una estimulación prolongada, la integridad funcional del sistema serotoninérgico (síntesis, liberación y recaptación de serotonina) puede estar comprometida. Estos hallazgos experimentales ponen en evidencia la importancia que tienen los parámetros de estimulación, así como las estructuras dianas, en el control de las crisis epilépticas en los distintos modelos experimentales.

Estudio	Estimulación	Proconvulsivante	Duración estímulo
Kovacs y Zoll, 1974	1 msec, 8-10 Hz y 0.2-0.24 mA	PTZ (i.p)	64 minutos
Nishi et al., 1980	0.2 msec, 10 Hz y 2-4 V	Carbacol (intrahipocampal)	65 minutos
Perryman et al., 1980	0.1 ms, 10 Hz, 1 mA durante 10 minutos alternado con periodos de 10 minutos estimulación	Hidróxido de aluminio (intrahipocampal)	24 horas

Tabla 8. Protocolos de estimulación del NMR empleados en investigaciones anteriores.

En nuestros experimentos se demostró que la estimulación del NMR (1 tren de 20Hz, 150 μ A durante 1s alternando con periodos de 1s sin estímulo) cada vez que sucedían los espasmos (estadio 2) reducían la incidencia de crisis tónico-

clónicas hasta en un 66,7 % en un modelo de epilepsia temporal inducida con PTZ (Javela et al., 2009). Lo que indica que este protocolo de estimulación del NMR es más efectivo en el control de las crisis que los estudios crónicos con DBS, los que han logrado una reducción del 50 % de las crisis convulsivas (Uthman et al., 1993). Además, este protocolo de estimulación disminuye la posibilidad de daño neuronal y fallo del sistema serotoninérgico. Así mismo, nuestros resultados experimentales indican que la estimulación del NMR genera un significativo aumento de la dosis y el tiempo requerido por el proconvulsivante para el establecimiento de las crisis, así como una reducción en el número y la duración de las mismas. De esta manera, se demuestra con este estudio que la estimulación del NMR es efectiva para reducir la incidencia de las crisis tónico-clónicas inducidas con PTZ y que las vías rafe-hipocampo son importantes en el control de las crisis temporales.

Como se ha señalado anteriormente, la estimulación cerebral puede considerarse como una nueva y prometedora alternativa para el tratamiento de las epilepsias intratables. Sin embargo, el mecanismo exacto de cómo actúa la estimulación sobre la modulación de las crisis convulsivas, así como los parámetros de estimulación y estructuras diana, continúan aun sin ser establecidos. Por lo tanto, la estimulación del NMR podría convertirse en una nueva terapia no farmacológica para el tratamiento de las epilepsias. Un equipamiento en tiempo real para la detección automática de la actividad convulsiva ha sido descrito previamente (Fanselow et al., 2000); en el futuro un equipo similar podría ser implementado en humanos. Además, estudios en otros animales y con otros modelos de crisis convulsivas serán necesarios para determinar si es apropiado extrapolar los hallazgos presentados en esta tesis en pacientes humanos y determinar cuáles son los mejores métodos para hacerlo.

La estimulación eléctrica del Núcleo Medial del Rafe modula el SE inducido con PTZ

Anteriores estudios habían demostrado que el proconvulsivante PTZ es dependiente de las dosis así como de la edad de los sujetos de experimentación, por lo cual animales inmaduros pueden alcanzar un SE después de una elevada dosis acumulada de PTZ (Pereira de Vasconcelos, 1995; Nehlig y Pereira de Vasconcelos, 1996; Pineau et al, 1999; Erdogan et al., 2004). Dado que la estimulación del NMR es capaz de regular las crisis temporales en un modelo de kindling químico con PTZ, se investigó si el mismo protocolo de estimulación era capaz de modular un SE inducido con PTZ en animales inmaduros. Nuestros resultados nos indican que la estimulación del NMR impidió el establecimiento del SE inducido PTZ en el 100% de los animales tratados. Así mismo, la estimulación del NMR tuvo el mismo efecto anticonvulsivo observado en el modelo de kindling con PTZ; es decir, un significativo aumento de la dosis y el tiempo requerido por el proconvulsivante para el establecimiento de las crisis, así como la reducción en el número y la duración de las mismas. Por consiguiente, se puede concluir que el protocolo de estimulación eléctrica empleada para el NMR es efectivo tanto en el caso del kindling químico, como en un modelo de SE.

Participación de los receptores de serotonina tipo 5-HT en la modulación de las crisis convulsivas inducidas con PTZ

Tras determinar que la estimulación del NMR era efectiva en controlar las crisis inducidas por un kindling químico así como el SE inducido por PTZ, se estudió si esta regulación era consecuencia de la liberación de serotonina tras la estimulación. Como se indicó anteriormente, en años recientes se ha incrementado la evidencia de que la neurotransmisión serotoninérgica interviene en una amplia variedad de crisis inducidas experimentalmente, así mismo, receptores de 5-HT son expresados en casi todas las redes que involucran las epilepsias. Hasta la fecha, se ha podido determinar que los receptores serotoninérgicos subtipo 5-HT_{1A}, (Gariboldi et al., 1996; Lopez-Meraz et al., 2005), 5HT₇ (Perićić & Švob Štrac, 2007) y 5HT_{2c} (Tecott et al., 1995; Upton et al., 1998)

juegan un papel importante en la modulación de las crisis convulsivas en modelos animales experimentales (Gariboldi et al., 1996; Bagdy et al., 2007). En el presente trabajo se ha demostrado que los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5HT_{2c} y 5HT₇ participan en el control de las crisis temporales inducidas por PTZ ya que la estimulación del NMR en presencia de antagonistas específicos contrarrestó el efecto antiepiléptico de la estimulación. Además, la administración de los antagonistas de los receptores tipo 5HT_{1A} y 5HT₇, en ausencia de estimulación del NMR, reduce significativamente el número de crisis (inyectados sistémicamente) y la duración de las mismas (aplicados mediante microperfusión). El efecto de los antagonistas puede explicarse porque bloquean la acción de la serotonina endógena liberada como consecuencia de las convulsiones inducidas por PTZ.

Por otro lado, la evidencia neuroanatómica ha demostrado una densa innervación de fibras de 5-HT en el hipocampo, principalmente originadas en el NMR. Estas fibras proyectan en su mayoría al stratum radiatum del hipocampo y débilmente al striatum oriens y al giro dentado (Azmitia y Segal, 1978; Oleskevich y Descarries, 1990). Así mismo, los receptores de 5-HT_{1A} están presentes tanto en neuronas corticales como en neuronas granulares y piramidales del hipocampo (Francis et al., 1992). Estos receptores se encuentran principalmente localizados en las proyecciones dendríticas de las neuronas piramidales y granulares (Pompeiano et al., 1992). Por su parte, el receptor del 5-HT_{2C}, está ampliamente distribuido y presente en las áreas del sistema límbico (núcleo accumbens, hipocampo, amígdala) (Palacios et al., 1991; Radja., 1991), Por otro lado, la expresión de los receptores de 5-HT₇ es relativamente alta en tálamo, hipotálamo e hipocampo, con niveles generalmente más bajos en áreas tales como la corteza cerebral y la amígdala (To et al., 1995; Gustafson et al., 1996; Stowe y Barnes, 1998). La ubicación neuroanatómica del receptores de 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₇ se correlaciona con nuestros estudios de PET, en donde estructuras mayoritariamente ricas en estos receptores como el tálamo, hipocampo y estriado, están involucradas en las crisis inducidas con el PTZ. Además, estas mismas estructuras están involucradas en los mecanismos neuronales del inicio y propagación de la crisis epilépticas (Iadarola y Gale.,

1982; Fisher et al., 1992; Chkhenkeli y Chkhenkeli 1997; Velasco et al., 2000; Chabardes et al., 2002; Hodaie et al., 2002; Goodman., 2005).

Existe evidencia electrofisiológica de que la serotonina puede hiperpolarizar neuronas piramidales en CA1 y CA3 y células granulares (Ropert, 1988; Baskys et al., 1989; Beck y Choi, 1991; Beck et al., 1992; Ghadimi y Jarolimek, 1994), mediante el incremento de la conductancia de K^+ calcio dependiente (Beck y Choi, 1991; Beck et al., 1992). Además, estudios experimentales indican que los antagonistas de los receptores 5-HT_{1A}, y 5-HT₇ inhiben la posthiperpolarización lenta en neuronas piramidales CA1 y CA3 hipocámpales (Beck et al., 1992; Beck y Bacon 1998a,b McCormick y Wang, 1991), jugando un importante rol en la regulación de la excitabilidad. Se ha reconocido que una regulación anormal de la posthiperpolarización puede contribuir a la epileptogénesis (Matsumoto y Ajmone-Marsan, 1964; Alger y Nicoll, 1980; Traub et al., 1993; Martín et al., 2001), dado que la posthiperpolarización es un factor crítico que limita la duración y propagación de las crisis. Por otro lado, existe un paralelismo entre el receptor tipo 5-HT_{1A} y 5-HT₇ (Le Corre, 1997), dado que ambos tienen similitudes farmacológicas incluida una alta afinidad por los agonistas de serotonina, 5-carboxamidotryptamine (5-CT) y 8-OH-DPAT (Lovenberg et al. 1993; Peričić et al., 2005; Lopez-Meraz et al., 2007 Peričić y Strac, 2007). Por lo tanto, parece probable que la acción anticonvulsiva de la estimulación del NMR pueda ser mediada por la inhibición directa de la excitabilidad neuronal debido al efecto de liberación de serotonina en la conductancia iónica de la membrana, al menos en lo que se refiere a los receptores de serotonina tipo 5-HT_{1A} y 5-HT₇.

Actividad metabólica del cerebro durante las crisis inducidas por kindling con PTZ

Nuestro siguiente objetivo fue determinar los cambios metabólicos que ocurren durante las crisis epilépticas mediante el empleo del Micro-PET. Esta caracterización es novedosa dado que, hasta la fecha, no se había empleado el modelo de kindling químico con PTZ para determinar las estructuras de mayor captación de glucosa durante las crisis epilépticas. Los estudios estáticos con el

Micro-PET indican un hipometabolismo en todas las estructuras cerebrales estudiadas (Bascuñana et al., 2009). Estos resultados coinciden con los obtenidos en trabajos anteriores realizados con otros modelos animales de epilepsia y PET (Goffin et al., 2009; Guo et al., 2009) en los que se observa un hipometabolismo en ciertas estructuras cerebrales tanto en fases tempranas como en fases crónicas. En nuestro estudio las estructuras mas afectadas por el hipometabolismo fueron hipocampo, tálamo y estriado. Estos resultados, junto con los obtenidos por otros grupos con otros modelos, indican que estas estructuras están involucradas en los mecanismos neuronales del inicio y propagación de la crisis epilépticas (Iadarola y Gale., 1982; Fisher et al., 1992; Chkhenkeli y Chkhenkeli 1997; Velasco et al., 2000; Chabardes et al., 2002; Hodaie et al., 2002; Goodman., 2005). Sin embargo, en los estudios dinámicos se obtuvieron resultados diferentes a los estudios estáticos, observándose un aumento de la velocidad de captación de FDG y un hipermetabolismo, con una captación similar en tálamo, hipocampo y estriado, en los animales tratados con PTZ con respecto a los controles. Estos datos coinciden con los publicados para el modelo de PTZ en fMRI por diferentes autores (Brevard et al., 2006; Keogh et al., 2005). Es importante destacar que la primera estructura afectada por este fármaco es el tálamo, para después modificar la actividad de otras estructuras como hipocampo y áreas corticales. Esa observación se correlaciona con los estudios que demuestran que las neuronas talámicas, así como de la corteza retrosplenial y el giro dentado, pueden contribuir a controlar el inicio de la crisis tónico-clónicas generalizadas (Brevard et al., 2006). La explicación de las diferencias observadas entre los estudios estáticos y dinámicos radica en que los protocolos de adquisición son diferentes. En los estudios dinámicos se adquieren los datos durante la fase crítica o ictal, mientras que en los estudios estáticos se adquieren 30 minutos después iniciada crisis convulsiva. Teniendo en cuenta la resolución del PET, el protocolo de adquisición dinámico permite detectar los cambios que ocurren en la fase ictal o crítica mientras que el protocolo de adquisición estático informa de la fase de recuperación luego de la depresión postictal.

Redistribución de los receptores de serotonina por estimulación del NMR

Como último objetivo del presente trabajo de tesis doctoral, se buscó determinar, mediante autorradiografía, la redistribución y densidad de receptores de serotonina como consecuencia de la estimulación del NMR. Para este objetivo se empleó un radiotrazador específico de 5-HT_{1A}, el ¹⁸F-MPPF (Aznavour y Zimmer 2007). Cabría esperar que la estimulación del NMR redujera la densidad del ligando fijado al receptor de 5-HT_{1A}, ya que la liberación de serotonina al estimular el NMR no permitiría la fijación de nuevos ligandos al estar el receptor ocupado. Así mismo, se esperaría que esta reducción tuviera su máxima expresión en regiones donde el receptor 5-HT_{1A} se expresa en una alta densidad, como CA1 del hipocampo, septum, amígdala, corteza entorrinal y núcleos medial y dorsal del rafe. Sin embargo, nuestros resultados con autorradiografía con [¹⁸F]-MPPF no evidenciaron ninguna diferencia significativa entre los grupos experimentales. En un estudio llevado a cabo en pacientes epilépticos empleando el trazador [¹⁸F] MPPF, se observó una disminución de la fijación del ligando en la zona ictal epileptógena (Merlet et al., 2004). Esto puede deberse a la acción de la glicoproteína P, ya que es conocida por regular fuertemente la penetración de [18F] MPPF en el cerebro (Passchier et al., 2000; Elsinga et al., 2004, 2005) y se ha reportado su incremento en el foco epiléptico (Kwan y Brodie, 2005). Por otro lado, en experimentos en ratas anestesiadas, la unión de [¹⁸F]-MPPF se determinó mediante diálisis mientras se estimulaba el NMR a 20 HZ durante 30 minutos, encontrándose un significativo incremento de niveles extracelulares de 5-HT en el hipocampo asociado con una significativa reducción (27-76 %) de la unión específica del [¹⁸F]-MPPF en esta región (Rbah et al., 2003). En nuestros resultados no se encontraron cambios al estimular el NMR. Una posible causa es que nuestro protocolo de epilepsia con PTZ es agudo lo que no provocaría un cambio en la población de receptores, al no ser una crisis convulsiva crónica. Así mismo, otra posible causa se deba a que en nuestro caso se extrajo el cerebro aproximadamente 30 minutos después de la última estimulación, por lo que la serotonina liberada por las aferencias del rafe pudo haber sido recaptada por las neuronas, impidiendo la fijación del 18F-MPPF a sus receptores.

Por otro lado, en nuestro experimento empleando ratas *ex vivo* no estimuladas, la autorradiografía con ^{18}F -FDG evidenció un aumento de la actividad metabólica en la zona en donde se había inyectado el PTZ (CA1 del hipocampo del hemisferio izquierdo, una zona rica en receptores de $5\text{-HT}_{1\text{A}}$). Posteriormente, los mismos cortes autoradiográficos con $[^{18}\text{F}]$ MPPF mostraron una disminución en la densidad de receptores acoplados al ligando de $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ en las mismas estructuras donde el ^{18}F -FDG había mostrado hipermetabolismo. En este último experimento, el protocolo de generación de crisis convulsivas con PTZ fue inducido mediante microinyección directa en hipocampo en el hemisferio izquierdo. De esta manera el PTZ fue suministrado de manera aguda (realizado en un solo momento empleando una única dosis) y locamente en hipocampo generando un aumento en la captación de ^{18}F -FDG. Este hipermetabolismo se había visto en nuestros experimentos dinámicos con ^{18}F -FDG con Micro-PET y está asociado al estado ictal en la crisis, algo que queda en evidencia en nuestros experimentos con autorradiografía. Además, este estudio nos confirma la participación de la serotonina y específicamente del receptor $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ en las crisis inducidas con PTZ, al observar una disminución de receptores $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ marcados con el ligando de $[^{18}\text{F}]$ MPPF en las mismas estructuras donde se evidencia un hipermetabolismo con el ^{18}F -FDG.

Como se hipotetizó anteriormente, las crisis inducidas por PTZ liberan serotonina y esta liberación provoca una reducción en la densidad de $[^{18}\text{F}]$ MPPF fijado al receptor de $5\text{-HT}_{1\text{A}}$. Como se había demostrado en un estudio anterior *ex vivo*, el $[^{18}\text{F}]$ MPPF tienen una alta afinidad por el hipocampo (Plenevaux et al., 2000), lo cual queda reflejado en nuestro estudio, ya que en el hemisferio contralateral al PTZ se observa una alta densidad de receptores acoplados al ligando de $[^{18}\text{F}]$ MPPF. Analizados en su conjunto, nuestros resultados confirman que el receptor de $5\text{-HT}_{1\text{A}}$ está implicado en la modulación de las crisis convulsivas inducidas por PTZ.

VI. CONCLUSIONES

La estimulación eléctrica del NMR sincronizada con el inicio de las crisis es efectiva en el control de la actividad epileptiforme en un modelo de kindling con PTZ.

Un protocolo de estimulación sincronizado con el inicio de la crisis y aplicado en forma intermitente hasta la desaparición de ésta, es más efectivo para el control de las convulsiones que aquellos protocolos en los que se estimula prolongadamente y en forma continuada.

La estimulación eléctrica del NMR sincronizada con el inicio de las crisis es capaz de abolir el *SE* inducido por PTZ en animales jóvenes.

Los estudios indican que la estimulación de las vías serotoninérgicas pueden ser una alternativa terapéutica válida para el control de las crisis epilépticas en aquellos pacientes refractarios al tratamiento farmacológico.

Los antagonistas serotoninérgicos de los subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2c} y 5-HT₇ son proconvulsivantes en el modelo de kindling químico por PTZ y están involucrados en el control de las crisis epilépticas por estimulación del NMR.

Las crisis convulsivas inducida por el PTZ provoca un aumento del metabolismo cerebral, principalmente en tálamo, hipocampo y estriado.

El descenso de la actividad neuronal durante la depresión post-ictal se correlaciona con un hipometabolismo generalizado en todas las estructuras cerebrales estudiadas. Este descenso de la captación de 18F-FDG es más notable en las estructuras en las que el aumento de actividad en la fase ictal es mayor: tálamo, hipocampo y estriado.

Existe un aumento de la actividad metabólica con 18F-FDG y una reducción en la densidad de [18F] MPPF fijado al receptor de 5-HT_{1A} lo que confirma su implicación en la modulación de las crisis convulsivas inducidas por PTZ.

Mecanismo de control de las crisis temporales en un modelo de kindling químico

La vía rafe-hipocampal es fundamental en la fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

-
- Abbott NJ (2002)** Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat*; 200(6):629-638.
- Adell A, Celada P, Abellan MT, Artigas F (2002)** Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev*. 39:154-180
- Aghakhani Y et al., (2006)** Cortical and thalamic fMRI responses in partial epilepsy with focal and bilateral synchronous spikes. *Clinical Neurophysiology*; 117:177-191.
- Aghajanian GK y Wang RY (1977)** Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res*. 122(2): 229-242.
- Agnew WF, McCreery DB (1990)** Considerations for safety with chronically implanted nerve electrodes. *Epilepsia* 31:S27-S32
- Agnew WF, McCreery DB, Yuen TG, Bullara LA (1989)** Histologic and physiologic evaluation of electrically stimulated peripheral nerve: considerations for the selection of parameters. *Ann Biomed Eng* 17:39-60.
- Alger BE, Nicoll RA (1980)** Epileptiform burst after hyperpolarization:calciumactivated potassium potential in hippocampal CA1 pyramidal cells. *Science* 210:1122-1124.
- Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O (1990)** Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine1A receptor gene. *J Biol Chem*; 265(10):5825-32.
- Albensi BC, Oliver DR, Toupin J, Odero G (2007)** Electrical stimulation protocols for hippocampal synaptic plasticity and neuronal hyper-excitability: are they effective or relevant? *Exp Neurol*. 204(1); 1-13.
- Andrade R. Andrade, R.C. Malenka, R.A. Nicoll, (1986),** A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus, *Science* 234: 1261-1265.
- Andrade R y Nicoll, RA (1987).** Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol*, 394: 99-124.
- Andre et al., (2007)** Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model, *Epilepsia* 48 (Suppl. 5) (2007), pp. 41-47
- André V, Pineau N, Motte J, Marescaux C, Nehlig A (1998)** Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylentetrazol in the immature and adult rat: a c-Fos immunohistochemical study. *Eur J Neurosci*. 10(6): 2094-106.
- André V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM (2001)** Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 11: 452-468.
- Applegate CD y Tecott LH (1998)** Global increases in seizure susceptibility in mice lacking 5-HT_{2C} receptors: a behavioural analysis. *Exp. Neurol*. 154: 522-530.
- Artigas F. y Romero L (1996)** Enhancement of SSRI effects by 5HT_{1A} antagonists. Regional selectivity and role of somatodendritic autoreceptors. *Soc. Neurosci. Abstr* 22: 527.19.
- Arvidsson LE, Hackzell U, Nilsson JL, Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikstrom H (1981)** 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J Med Chem*. 24(8):921-3.
- Audet MA, Descarries L, Doucet G (1989)** Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex. *J. Chem. Neuroanat*. 2:29-44.
- Aubert A, et al., (2002)** A model of the coupling between brain electrical activity, metabolism, and hemodynamics: application to the interpretation of functional neuroimaging. *Neuroimage* 2002; 17(3):1162-1181.
- Azmitia EC y Henriksen SJ (1976)** A modification of the Falck-Hillarp technique for 5-HT fluorescence employing hypertonic formaldehyde perfusion. *J. Histochem. Cytochem*. 24:1286-1288.
- Azmitia E y Segal M (1978)** An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J.Comp. Neurol*. 179:641-668.
- Aznavour N., Rbah L., Léger L., Buda C., Sastre J.P., Imhof A., Charnay Y., Zimmer L (2006a).** A comparison of in vivo and in vitro neuroimaging of 5-HT_{1A} receptor binding sites in the cat brain. *J. Chem. Neuroanat*. 31:226-232.

- Aznavour N., Rbah L., Riad M., Reilhac A., Costes N., Descarries L., Zimmer L** (2006b) A PET imaging study of 5-HT_{1A} receptors in cat brain after acute and chronic fluoxetine treatment, *NeuroImage* 33: 834–842.
- Aznavour N y Zimmer L.** (2007) [¹⁸F] MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT_{1A} receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology*; 52(3):695-707.

B

- Bachiega JC, Blanco MM, Perez-Mendes P, Cinini SM, Covolan L, Mello LE** (2008) Behavioral characterization of pentylenetetrazol-induced seizures in the marmoset. *Epilepsy Behav.* 2008 13(1):70-6.
- Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R** (2007) Serotonin and epilepsy. *J Neurochem.* 100: 857-873.
- Baker KG, Halliday GM, Törk I** (1990) Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 301(2):147-61.
- Baker KG, Halliday GM, Halasz P, Hornung JP, Geffen LB, Cotton RG, Törk I** (1991) Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse.* 4: 301-20.
- Banach M, Gurdziel E, Jędrzych M, Borowicz KK** (2011) Melatonin in experimental seizures and epilepsy. *Pharmacol Rep:* 63(1):1-11.
- Barbara E, et al.,** (2002) The Use of 2-Deoxy-2-[¹⁸F]Fluoro-D-Glucose (FDG-PET) Positron Emission Tomography in the Routine Diagnosis of Epilepsy. *Molecular Imaging and Biology*; 4(3): 245-252.
- Baraban J, Aghajanian** (1981) Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electronic microscopic autoradiography. *Brain Res.* 24:1-11.
- Barnes NM, Sharp T** (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38: 1083–1152.
- Barros LF, et al.,** (2005) Why glucose transport in the brain matters for PET. *Trends Neurosci*; 28(3):117-119.
- Bascuñana et al.,** (2009) XIII Congreso Sociedad Española de Neurociencia. 16-19 September. Posters; estudio mediante tomografía por emisión de positrones (PET) de la actividad metabólica del sistema nervioso central durante la inactivación del sistema gabaérgico.
- Baskys A, Niesen CE, Davies MF, Carlen PL** (1989) Modulatory actions of serotonin on ionic conductances of hippocampal dentate granule cells. *Neuroscience* 29:443-451
- Beck SG, Choi KC** (1991) 5-Hydroxytryptamine hyperpolarizes CA3 hippocampal pyramidal cells through an increase in potassium conductance. *Neurosci Lett* 133:93-96.
- Beck SG, Choi KC, List TJ** (1992) Comparison of 5-hydroxytryptamine_{1A} mediated hyperpolarization in CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 263:350-359.
- Beck S y Bacon W** (1998a) 5-HT₇ receptor mediated inhibition of sAHP in CA3 hippocampal pyramidal cells. *Fourth IUPHAR Satellite meeting on Serotonin.* Rotterdam, S1.3.
- Beck S y Bacon W** (1998b). 5-HT₇ receptor mediated inhibition of sAHP in CA3 hippocampal pyramidal cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24:435-4.
- Berg AT and Berkovic, SF and Brodie, MJ and Buchhalter, J and Cross, JH and Boas, WV and Engel, J and French, J and Glauser, TA and Mathern, GW and Moshe, SL and Nordli, D and Plouin, P and Scheffer, IE** (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia*, 51(4): 676–685
- Bernasconi N, et al.,** (2005) Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain*; 126(Pt 2):462-469.
- Berkovic SF, Andermann F, Olivier A, Ethier R, Melanson D, Robitaille Y, Kuzniecky R, Peters T, Feindel W** (1992) Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy demonstrated by magnetic resonance imaging. *Ann Neurol.* 29(2):175-82.
- Ben-Menachem E, Mañon-Espaillet R, Ristanovic R, et al.** (1994) First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures. *Epilepsia*. 35:616–626.

- Bialer M, Johannessen SI, Kupferberg HJ, Levy RH, Perucca E, Tomson T** (2007) Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Res.* 73(1):1-52.
- Briellmann RS, et al.,** (2004) Structural abnormalities remote from the seizure focus: a study using T2 relaxometry at 3 T. *Neurology*, 63(12):2303-2308.
- Bloss EB, y Hunter RG** (2010) Hippocampal kainate receptors. *Vitam Horm.*82: 167-84.
- Bobula B, Zahorodna A** (2001) Different receptor subtypes are involved in the serotonin-induced modulation of epileptiform activity in rat frontal cortex in vitro. *J. Physiol Pharmacol.* 52:265-274.
- Bonaventure P, et al.,** 2002) Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT) (7) receptor distribution using [(3)H]5-carboxamidotryptamine and [(3)H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT (1A) knockout and 5-HT (1A/1B) double-knockout mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 302:240e248.
- Bonaventure P., Nepomuceno D., Hein L., Sutcliffe JG., Lovenberg T., Hedlund PB** (2004) Radioligand binding analysis of knockout mice reveals 5-hydroxytryptamine7 receptor distribution and uncovers 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin interaction with alpha(2) adrenergic receptors. *Neuroscience.* 124(4):901-911.
- Bonhaus DW, Weinhardt KK, Taylor M, DeSouza A, McNeeley PM, Szczepanski K, Fontana DJ, Trinh J, Rocha CL, Dawson MW, Flippin LA, Eglen RM** (1997). RS-102221: a novel high affinity and selective, 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36: 621-629.
- Boon P, Raedt R, de Herdt V, Wyckhuys T, Vonck K** (2009) Electrical stimulation for the treatment of epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2:218-27.
- Bourson A, Kapps V, Zwingelstein C, Rudler A, Boess FG, Sleight AJ** (1997) Correlation between 5-HT₇ receptor affinity and protection against sound-induced seizures in DBA/2J mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356:820-826.
- Bradford HF** (1995) Glutamate, GABA and epilepsy. *Prog Neurobiol.* 47(6): 477-511.
- Bradley PB, Handley SL, Cooper SJ, Key BJ, Barnes NM, Coole JH** (eds) (1992) Serotonin, CNS receptors and brain function. Oxford: Pergamon Press.
- Brennan TJ, Seeley WW, Kilgard M, Schreiner CE, Tecott LH** (1997) Sound-induced seizures in serotonin 5-HT_{2c} receptor mutant mice. *Nat Genet.* 16(4):387-90.
- Brevard ME., Kulkarni, P., King, JA., Ferris, C.F** (2006) Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia.* 47:745-54.
- Briley M, Moret C** (1993) Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. *Clin Neuropharmacol.* 16: 387-400.
- Brodal A, Taber E, Walberg F** (1960a) The raphe nuclei of the brain stem in the cat. II. Efferent connections. *J. Comp. Neurol.* 144:239-260
- Brodal A, Taber E, Walberg F.** (1960b) The raphe nuclei of the brain stem in the cat. III. Afferent connections. *J. Comp. Neurol.* 144:261-282
- Brooks-Kayal AR, Raol YH, Russek SJ** (2009) Alteration of epileptogenesis genes. *Neurotherapeutics*:312-8.
- Bruehl C, et al.,** (1998) Uncoupling of blood flow and metabolism in focal epilepsy. *Epilepsia* 39(12):1235-1242
- Buhot MC., Martin S., Segu L** (2000) Role of serotonin in memory impairment. *Annals of Medicine.* 32:210e221.

C

- Cain DP** (1981) Transfer of pentylenetetrazol sensitization to amygdaloid kindling. *Pharmacol Biochem Beba.*4:533-6.
- Carrillo M, Ricci LA, Coppersmith GA, Melloni RH Jr** (2009) The effect of increased serotonergic neurotransmission on aggression: a critical meta-analytical review of preclinical studies. *Psychopharmacology.* 3:349-68.
- Cascino GD, et al.,** (1991) Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol*, 30:31-36.
- Castell F y Cook GJ** (2008) Quantitative techniques in 18FDG PET scanning in oncology. *Br J Cancer.* 98:1597-601.

- Chabardes S, Kahane P, Minotti L, Koudsie A, Hirsch E, Benabid AL.** (2002) Deep brain stimulation in epilepsy with particular reference to the subthalamic nucleus. *Epileptic Disord* 2002;4 Suppl 3:S83–S93.
- Chkhenkeli SA, Chkhenkeli IS** (1997) Effects of therapeutic stimulation of nucleus caudatus on epileptic electrical activity of brain in patients with intractable epilepsy. *Stereotact Funct Neurosurg.* 69:221–224.
- Chapin EM y Andrade A** (2001) 5-HT(7) receptor-mediated depolarization in the anterodorsal thalamus. II. Involvement of the hyperpolarization activated current I(h). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297:403-409.
- Chaput Y y de Montigny C** (1988) Effects of the 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, BMY 7378, on 5-hydroxytryptamine neurotransmission: electrophysiological studies in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther.* 246(1):359-70.
- Chinaglia G, Landwehrmeyer B, Probst A, Palacios JM** (1993) Serotonergic terminal transporters are differentially affected in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: an autoradiographic study with [3H]citalopram. *Neuroscience.* 54:691-699.
- Christensen AV y Larsen JJ.** (1982) Antinociceptive and anticonvulsive effect of THIP, a pure GABA agonist. *Pol J Pharmacol Pharm.* 34:127-134.
- Chugani DC.** (2004) Serotonin in autism and pediatric epilepsies. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews.* 10:112e116.
- Clark M, Post RM, Weiss SR, Cain CJ, Nakajima T** (1991) Regional expression of c-fos mRNA in rat brain during the evolution of amygdala kindled seizures. *Brain Res Mol Brain Res.* 1: 55-64.
- Clarke WP, Yocca FD, Maayani S** (1996) Lack of 5-hydroxytryptamine 1A-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277: 1259–1266.
- Cliffe IA, Brightwell CI, Fletcher A, Forster EA, Mansell HL, Reilly Y, Routledge C, White AC** (1993) (S)-N-tert-Butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide (S)-WAY-100135: a selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 36:1509-1510.
- Clifford B Saper** (2000) Brain Stem Modulation of Sensation, Movement, and Consciousness Seizure and Epilepsy. In Kandel ER, Schwartz JH, T.M J, (Eds) *Principles of Neural Science*. 4th ed. McGraw-Hill, New York; 910-935.
- Coccaro EF, Murphy DL** (eds) (1990) *Serotonin in major psychiatric disorders*. Washington: American Psychiatric Press.
- Colino y Halliwell** (1987) Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature.* 328:73-77.
- Cooper IS, Upton AR.** (1978) Effects of cerebellar stimulation on epilepsy, the EEG and cerebral palsy in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol (suppl 34):*349-54.
- Cornford EM, et al.,** (1998) Dynamic [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography and hypometabolic zones in seizures: reduced capillary influx. *Ann Neurol*; 43(6):801-808.
- Cornford EM, et al.,** (1994) The human brain GLUT1 glucose transporter: ultrastructural localization to the blood-brain barrier endothelia. *J Cereb Blood Flow Metab*; 14(1):106-112
- Cornford EM, et al.,** (2000) Acute upregulation of blood-brain barrier glucosa transporter activity in seizures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 279(3):1346-1354.
- Conrad LC, Leonard CM, Pfaff DW** (1974) Connections of the median and dorsal raphe nuclei in the rat: an autoradiographic and degeneration study. *J Comp Neurol.* 156: 179-205
- Coppen A., Shaw D.M., Farrell J.P.** (1963). Potentiation of the antidepressive effect of a monoamine-oxidase inhibitor by tryptophan. *Lancet* 1, 79e81
- Craven I, Griffiths PD, Hoggard N** (2011) Magnetic resonance imaging of epilepsy at 3 Tesla. *Clin Radiol.* 66(3):278-86.
- Crino, et al.,** (2001) Differential expression of glutamate and GABA_A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia, *Neurology* 56 (2001), pp. 906–913
- Croucher MJ y Bradford HF.** (1990) NMDA receptor blockade inhibits glutamate-induced kindling of the rat amygdala. *Brain Res.* 506(2):349-52.
- Croucher MJ., Cotterell kl., Bradford HF** (1992) Competitive NMDA receptor antagonists raise electrically kindled generalized seizure thresholds. *Neurnchem Res.* 17(5):409-413.
- Cross AJ** (1990) Serotonin in Alzheimer-type dementia and other dementing illnesses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 600:405-415.

- Cutrerá RA., Saboureaux M., Pevet P** (1996). Phase-shifting effect of 8-OHDPAT, a 5-HT_{1A}:5-HT₇ receptor agonist, on locomotor activity in golden hamster in constant darkness. *Neurosci Lett.* 210:1-4.

D

-
- Dedeurwaerdere S, Jupp B, O'Brien TJ** (2007) Positron emission tomography in Basic epilepsy research: a view of the epileptic brain. *Epilepsia.* 48(S4): 56-64.
- De Chaffoy DE, Courcelles D, Leysen JE, De Clerck F, Van Belle H, Janssen PA** (1985) Phospholipid turnover is the signal transducing system coupled to serotonin-S₂ receptor sites. *J. Biol. Chem.* 260:7603-7608.
- De Ilano Ignacio** (2005). Epilepsias farmacorresistentes del lóbulo temporal. Aportaciones desde la neurofisiología clínica. Tesis de doctorado inédita. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- DeGiorgio CM, Schachter SC, Handforth A, et al.** (2000) Prospective long-term study of vagus nerve stimulation for the treatment of refractory seizures. *Epilepsia.* 41:1195-1200.
- De Herdt V, Boon P, Ceulemans B, et al** (2007) Vagus nerve stimulation for refractory epilepsy: a Belgian multicenter study Eur J Paediatr Neurol;11:261-269.
- DeLorenzo RJ** (1990a) Status epilepticus: concepts in diagnosis and treatment. *Sem Neurol.* 2: 396-405.
- DeLorenzo RJ** (1990b) Status epilepticus. In: Current therapy in neurologic disease-3. Philadelphia, PA: B.C. Decker.47-53.
- Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A.** (1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol.* 20;207(3):239-54.
- Diehl B, et al.,** (2001) Fluid-attenuated inversion recovery: correlations of hippocampal cell densities with signal abnormalities. *Neurology;* 57(6):1029-1032.
- Diehl B, et al.,** (2003) Neocortical temporal FDG-PET hypometabolism correlates with temporal lobe atrophy in hippocampal sclerosis associated with microscopic cortical dysplasia. *Epilepsia;* 44(4):559-564.
- Dichter MA.** (2006) Models of epileptogenesis in adult animals available for antiepileptogenesis drug screening. *Epilepsy Res.* 68:31-35.
- Doherty CP, Cole AJ, Grant PE, Fischman A, Dooling E, Hoch DB, White TH, Cosgrove GR** (2004) Multimodal longitudinal imaging of focal status epilepticus. *Can J Neurol Sci.* 31:276-81.
- Doyle VM, Creba JA, Ruegg UT, Hoyer D** (1986) Serotonin increases the production of inositol phosphates and mobilises calcium via de 5-HT₂ receptor in A7r5 smooth muscle cells. Naunyn-Schmied. *Arch. Pharmacol.* 333:98-103.
- Dube, et al.,** (2001) Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat, *Exp. Neurol.* **167** (2001), pp. 227-241
- Durand DM** (2009) Control of seizure activity by electrical stimulation: effect of frequency. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2375.
- Duxon MS., Kennett GA., Lightowler S., Blackburn TP., Fone KC** (1997) Activation of 5-HT_{2B} receptors in the medial amygdala causes anxiolysis in the social interaction test in the rat. *Neuropharmacology* 36:601-608.

E

-
- Eccleston D., Ritchie I.M., Roberts M, HT** (1970) long term effects of midbrain stimulation on 5-hydroxyindole synthesis in rat brain. *Nature* 226, 84-85
- Ebersole JS, et al.,** (2002) Current Practice of Clinical Electroencephalography. 2002. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 3^a Edición.
- Ebersole JS.** (1997) Magnetoencephalography/magnetic source imaging in the assessment of patients with epilepsy. *Epilepsia;*38 Suppl 4:S1-5.

- Edgar DM., Miller JD., Prosser RA., Dean RR., Dement WC** (1993) Serotonin and the mammalian circadian system. II. Phase-shifting rat behaviour rhythms with serotonergic agonists. *J. Biol. Rhythms* 8:17-31.
- El Hamdi G., Pereira de Vasconcelos A., Vert P., Nehlig A** (1992) An experimental model of generalized seizures for the measurement of local cerebral glucose utilization in the immature rat. I. Behavioral characterization and determination of lumped constant. *Dev. Brain Res.* 69
- Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Vaalburg W, Van Waarde A** (2004) PET studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS, *Current Pharmaceutical Design* **10** (2004), pp. 1493–1503.
- Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Van Waarde A, Vaalburg W** (2005) Positron emission tomography studies on binding of central nervous system drugs and p-glycoprotein function in the rodent brain, *Molecular Imaging and Biology* **7** (2005), pp. 37–44
- Engel J** (2001) A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia.* 42: 796-803.
- Engel J, Jerome, Philip AS.** (2006) What should be modeled? In Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier, Amsterdam.
- Erdogan F, Golgeli A, Arman F, Ersoy AO** (2004) The effects of pentylenetetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory, and learning in rats. *Epilepsy Behav* 5:388-393.
- Erdoğan F, Gölğeli A, Küçük A, Arman F, Karaman Y, Ersoy A** (2005) Effects of pentylenetetrazole-induced status epilepticus on behavior, emotional memory and learning in immature rats. *Epilepsy Behav.*;6(4):537-42
- Erdtmann-Vourliotis M, Riechert U, Mayer P, Grecksch G, Höllt V** (1998) Pentylenetetrazole (PTZ)-induced c-fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with naloxone. *Brain Res.* 792(2):299-308.

F

- Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ** (1988) The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature*.335 (6188):358-60.
- Ferré S, Cortés R, Artigas F** (1994) Dopaminergic regulation of the serotonergic raphe-striatal pathway: microdialysis studies in freely moving rats. *J. Neurosci.* 14:4839-4846.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J** (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46: 470-472.
- Fisher RS, Uematsu S, Krauss GL, Cysyk BJ, McPherson R, Lesser RP, Gordon B, Schwerdt P, Rise M.** (1992) Placebo-controlled pilot study of centromedian thalamic stimulation in treatment of intractable seizures. *Epilepsia* 33:841-851.
- Fisher R, et al.,** (2010) Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia*; 51(5):899-908.
- Forster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, Reilly Y, Fletcher A** (1995) A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 281(1): 81-8
- Fozard JR** (1989) The peripheral actions of 5-hydroxytryptamine. Oxford medical publications. Oxford.
- Francis PT, Pangalos MN, Pearson RC, Middlemiss DN, Stratmann GC, Bowen DM.** (1992) 5-Hydroxytryptamine_{1A} but not 5-hydroxytryptamine₂ receptors are enriched on neocortical pyramidal neurones destroyed by intrastriatal volkensin. *J Pharmacol Exp Ther* 261:1273-1281
- Freund TF, Gulyas AI, Acsady L, Gorcs T, Toth K.** (1990) Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:8501-8505
- Frumberg DB., Fernando MS., Lee DE., Biegon A., Schiffer WK** (2007) Metabolic and behavioral deficits following a routine surgical procedure in rats. *Brain Res.* 1144; 209-18.
- Fujiwara Y, Nelson DL, Kashihara K, Varga E, Roeske WR, Yamamura HI** (1990) The cloning and sequence analysis of the rat serotonin-1A receptor gene. *Life Sci.* 47(22):PL127-32.

Furió, MC (2010) Análisis del metabolismo cerebral y su relación con la actividad eléctrica intercítica cortical en pacientes con epilepsia fármaco resistente Tesis doctoral Facultad de Medicina - Universidad Complutense de Madrid.

G

-
- García-Albea Ristol E** (2007) Epilepsia. Historia. Concepto. Síndromes epilépticos. Crisis epiléptica. Clasificación. Epidemiología. Valoración socioeconómica. *Medicine*. 9:4801-4805.
- García-March G., Sánchez-Ledesma MJ., Broseta J** (2008). Estimulación eléctrica vagal en el tratamiento de la epilepsia rebelde. Situación actual. *Neurocirugía*. 19(5).
- Gariboldi M, Tutka P, Samanin RA** (1996) Stimulation of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal hippocampus and inhibition of limbic seizures induced by kainic acid in rats. *Br J Pharmacol*. 119:813-818
- Gaillard WD, Kopylev L, Weinstein S, Conry J, Pearl PL, Spanaki MV, Fazilat S, Fazilat S, Venzina LG, Dubovsky E, Theodore WH.** (2002) Low incidence of abnormal (18)FDG-PET in children with new-onset partial epilepsy: a prospective study. *Neurology*; 58(5):717-22.
- Gastaut H** (1976) in Collaboration with an International Group of Experts: Dictionary of Epilepsy. Part I: Definitions. World Health Organization, Geneva 1973. German edition: H. Gastaut and J. Kugler: Wörterbuch der Epilepsie. Stuttgart, Hippokrates.
- Gelernter J, Rao PA, Pauls DL, Hamblin MW, Sibley DR, Kidd KK** (1995) Assignment of the 5HT₇ receptor gene (HTR7) to chromosome 10q and exclusion of genetic linkage with Tourette syndrome. *Genomics* 26:207-9
- Gershon Md, Drakontides Ab, Ross LI** (1965) serotonin: synthesis and release from the myenteric plexus of the mouse intestine. *Science*. 9:149:197
- Gershon MD** (2004) Serotonin receptors and transporters, roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther*. 20 (7)3-14.
- Ghadimi BM, Jarolimek W, Misgeld U** (1994) Effects of serotonin on hilar neurons and granule cell inhibition in the guinea pig hippocampal slice. *Brain Res* 633:27-32.
- Gibbs JW, McNamara JO** (2006) The Epilepsies: Phenotype and Mechanisms. In G. J. Siegel, Albers RW, Brady S, Price DL, (Eds) *Basic Neurochemistry*. Elsevier, London: 629-638
- Giovacchini G, et al.,** (2005) 5-HT_{1A} Receptors Are Reduced in Temporal Lobe Epilepsy After Partial-Volume Correction. *J Nucl Med*; 46(7):1128-1135.
- Gilbert ME** (1992) Neurotoxicants and limbic kindling. In The Vulnerable Brain and Environmental Risks. Vol. 1: *Malnutrition and Hazard Assessment*. 173–192. Plenum N.Y
- Gilbert ME y Goodman JH** (2006) Chapter 31- Chemical kindling. In Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier, Amsterdam.
- Gispert JD, et al.,** (2002) Cuantificación en estudios PET: Métodos y aplicaciones. *Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat*, 96 (1-2):13-27.
- Glien M, Brandt C, Potschka H, Voight H, Ebert U, Loscher W** (2001) Repeated low dose treatment of rats with pilocarpine: Low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res*;46:111–119
- Goffin K., Van Paesschen W., Dupont P., Van Laere K** (2009). Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Exp Neurol*. 217:205-9.
- Goddard GV** (1967) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature*. 214(5092):1020-1.
- Goodman JH, Berger RE, Tcheng TK.** (2005) Preemptive low-frequency stimulation decreases the incidence of amygdala-kindled seizures. *Epilepsia* 46:1-7.
- Godukhin OV, Levin SG, Parnyshkova EY** (2009) The effects of interleukin-10 on the development of epileptiform activity in the hippocampus induced by transient hypoxia, bicuculline, and electrical kindling. *Neurosci Behav Physiol*. 39(7): 625-31.
- Gozlan H., El Mestikawy S., Pichat L., Glowinski J., Hamon M** (1983) Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature*. 305:140e142.

- Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M** (1995) The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [³H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol.* 288(2):173-86.
- Graf M, Jakus R, Kantor S, Levay G, Bagdy G.** (2004) Selective 5-HT_{1A} and 5-HT₇ antagonists decrease epileptic activity in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neurosci Lett.* 359(1-2):45-8.
- Grønstad KO, DeMagistris L, Dahlström A, Nilsson O, Price B, Zinner MJ, Jaffe BM, Ahlman H** (1985) The effects of vagal nerve stimulation on endoluminal release of serotonin and substance P into the feline small intestine. *Scand J Gastroenterol* 20(2):163-9.
- Guo Y., Gao F., Wang S., Ding Y., Zhang H., Wang J., Ding MP** (2009). In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis: an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study. *Neuroscience.* 162: 972-9.
- Gustafson EL., Durkin MM., Bard JA., Zgombick J., Branchek TA** (1996) A receptor autoradiographic and in situ hybridisation analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 117:657-666

H

-
- Hagan JJ, et al.,** (2000) Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 3:539-48.
- Handforth A, DeGiorgio CM, Schachter SC, et al** (1998) Vagus nerve stimulation therapy for partial onset seizures: a randomized, active control trial. *Neurology.* 51:48-55.
- Handforth A, et al.,** (1994) Interictal spiking increases 2-deoxy[¹⁴C]glucose uptake and c-fos-like reactivity. *Ann Neurol;* 35(6):724-731.
- Halasy K, Miettinen R, Szabat E, Freund TF** (1992) GABAergic interneurons are the major postsynaptic targets of median raphe afferents in the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 4:144-153.
- Harrington MA, Oksenberg D, Peroutka SJ.** (1988) 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptors are linked to a Gi-adenylate cyclase complex in rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 154(1):95-8.
- Harte SE, Kender RG, Borszcz GS** (2005) Activation of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in the parafascicular nucleus suppresses the affective reaction of rats to noxious stimulation. *Pain.* 113(3):405-15.
- Hariz MI, Rehncrona S, Quinn NP, Speelman JD, Wensing C; Multicentre Advanced Parkinson's Disease Deep Brain Stimulation Group** (2008) Multicenter study on deep brain stimulation in Parkinson's disease: an independent assessment of reported adverse events at 4 years. *Mov Disord.* 15;23(3):416-21.
- Heisler L.K., Chu H.M., Brennan TJ., Danao JA., Bajwa,P., Parsons, LH., Tecott LH** (1998) Elevated anxiety and antidepressantlike responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.15049e15054.
- Heiss WD, et al.,** (1984) Regional kinetic constants and cerebral metabolic rate for glucose in normal human volunteers determined by dynamic positron emission tomography of [¹⁸F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *J Cereb Blood Flow Metab;* 4(2):212-223.
- Hellier J, Patrylo P, Buckmaster P, Dudek FE** (1998) Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: Assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res;* 31:73-84
- Herman ST** (2006) Clinical trials for prevention of epileptogenesis. *Epilepsy Res,* 68:35-38.
- Hillegaart V, Hjorth S, Ahlenius S** (1990) Effects of 5-HT and 8-OHDPAT on forebrain monoamine synthesis after local application into the median and dorsal raphe nuclei of the rat. *J. Neural Transm.* 81:131-145.
- Hodaie M, Wennberg RA, Dostrovsky JO, Lozano AM** (2002) Chronic anterior thalamus stimulation for intractable epilepsy. *Epilepsia.* 43:603- 608..
- Holder LK, Wernicke JF, Tarver WB** (1992) Treatment of refractory partial seizures: preliminary results of a controlled study. *Pacing Clin Electrophysiol.* 15:1557-1571.

- Hoffman, B.J., Mezey, E.**, (1989) Distribution of serotonin 5-HT_{1C} receptor mRNA in adult rat brain. *FEBS Lett.* 247, 453–462.
- Hornung JP** (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *The Journal of Chemical Neuroanatomy.* 26:331e343.
- Hoyer D y Martin G** (1997) 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology.* 36(4-5):419-28.
- Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey** (1994) VII. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin) *Pharmacol. Rev.* 1994;46:157-203.
- Humphrey PPA., Hartig P., Hoyer D** (1993) A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:233-236.
- Hume and Jones** (1998) Positron emission tomography (PET) methodology for small animals and its application in radiopharmaceutical preclinical investigation, *Nucl. Med. Biol.* 25, pp. 729–732.

I

- ILAE Internacional League Against Epilepsy** (1981) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia* 22:489-501
- ILAE Internacional League Against Epilepsy** (1989) Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. *Epilepsia* 30:389-399
- ILAE Internacional League Against Epilepsy** (2003) *Epilepsy; From Synapse to Society. A Practical Guide to Epilepsy.* 9th Epilepsy Teaching Weekend, 2003. St Anne's College, Oxford.
- Ito S, et al.**, (2007): Changes in central 5-HT_{1A} receptor binding in mesial temporal epilepsy measured by PET with [¹¹C]-WAY100635. *Epilepsy Research* 73: 111-118.
- Imai H, Steindler DA, Kitai ST** (1986) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 243(3):363-80.

J

- Jacobs BL y Azmitia EC** (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72:165-229.
- Jacobs MP, Fischbach GD, Davis MR, Dichter MA, Dingledine R, Lowenstein DH, Morrell MJ, Noebels JL, Rogawski MA, Spencer SS, Theodore WH** (2001) Future directions for epilepsy research. *Neurology.* 57:1536-1542.
- Jackson GD, Berkovic SF, Tress BM, Kalnins RM, Fabinyi GC, Bladin PF** (1990) Hippocampal sclerosis can be reliably detected by magnetic resonance imaging. *Neurology;* 40(12):1869-75.
- Jakus R, Graf M, Juhasz G, Gerber K, Levay G, Halasz P, Bagdy G** (2003) 5-HT_{2C} receptors inhibit and 5-HT_{1A} receptors activate the generation of spike-wave discharges in a genetic rat model of absence epilepsy. *Exp Neurol.* 184(2):964-72.
- Javela et al.**, (2009) 39th annual meeting of the Society for Neuroscience. 17-21 October. Posters; Modulation of lobe temporal seizures through the serotonergic raphe-hippocampal pathways. Chicago - United States
- Jasper J.R., Kosaka A., To ZP., Chang DJ., Eglen RM** (1997). Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7b}). *Br. J. Pharmacol.* 122:126–132
- Jobe PC, Dailey JW, Wernicke JF** (1999). A noradrenergic and serotonergic hypothesis of the linkage between epilepsy and affective disorders. *Crit Rev Neurobiol.* 13(4): 317-356.
- Jolas T y Aghajanian GK** (1997) Opioids suppress spontaneous and NMDA induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Brain Res.* 755:229-245
- Jupp B, Williams JP, Tesiram YA, Vosmansky M, O'Brien TJ** (2006) Hippocampal T2 signal change during amygdala kindling epileptogenesis. *Epilepsia.* 47:41-6.

- Jupp B, Williams J, Binns D, Hicks R, O'brien T (2007) Imaging small animal models of epileptogenesis *Neurology Asia*. 12(S1): 51–54
- Juul-Jensen P., Foldsprang A. (1983) Natural history of epileptic seizures. *Epilepsia*. 3:297-312.

K

- Kalén P, Strecker RE, Rosengren E, Björklund A (1989) Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula- dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA. *Brain Res*. 492: 187-202.
- Kalén P, Karlson M, Wiklund L (1985) Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H]aspartate tracing. *Brain Res*. 360: 285-297.
- Kandel ER, Part IX: Language, Thought, Mood, and Learning and Memory (2000) Kandel ER Schwartz JH, T.M J, (Eds) *Principles of Neural Science*. 4th ed. McGraw-Hill, New York; 1227-1246
- Kanner A y Campos M (2004) Epilepsia del lóbulo temporal. En: Campos M, Kanner A. *Epilepsias diagnóstico y tratamiento*. Santiago, Mediterráneo. 252-268.
- Kaufman M.J., Hartig P.R., Hoffman B.J (1995) Serotonin 5-HT_{2C} receptor stimulates cyclic GMP formation in choroid plexus. *J. Neurochem*. 64:199–205.
- Kaura S, Bradford HF, Young AM, Croucher MJ, Hughes PD (1995) Effect of amygdaloid kindling on the content and release of amino acids from the amygdaloid complex: in vivo and in vitro studies. *J Neurochem* 65(3): 1240-9.
- Kharlamov EA, Lepsveridze E, Meparishvili M, Solomonina RO, Lu B, Miller ER, Kelly KM, Mtchedlishvili Z (2011) Alterations of GABA(A) and glutamate receptor subunits and heat shock protein in rat hippocampus following traumatic brain injury and in posttraumatic epilepsy. *Epilepsy Res*.
- Kennett GA, Wood MD, Bright F, Trail B, Riley G, Holland V, Avenell KY, Stean T, Upton N, Bromidge S, Forbes IT, Brown AM, Middlemiss DN, Blackburn TP (1997) SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36:609-620.
- Keogh B.P., Cordes D., Stanberry L., Figler B.D., Robbins CA., Tempel BL., Green CG., Emmi A., Maravilla K.M., Schwartzkroin PA (2005) BOLD-fMRI of PTZ-induced seizures in rats. *Epilepsy Res*. 66:75-90.
- Kim DS, Kim JE, Kwak SE, Kim DW, Choi SY, Kwon OS, Kang TS (2007) Seizure activity selectively reduces 5-HT_{1A} receptor immunoreactivity in CA1 interneurons in the hippocampus of seizure-prone gerbils. *Brain Research* 1154: 181-193.
- Kornblum HI, Araujo DM, Annala AJ, Tatsukawa KJ, Phelps ME, Cherry SR (2000) In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET). *Nat Biotechnol*. 18(6): 655-660.
- Kosofsky BE y Molliver ME (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: Different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1:153-168.
- Kovacs DA, Zoll JG. (1974) Seizure inhibition by median raphe nucleus stimulation in rat. *Brain Res* 70:165-169.
- Kuhl DE, et al., (1978) Epileptic patterns of local cerebral metabolism and perfusion in man: investigation by emission computed tomography of 18F-fluorodeoxyglucose and 13N-ammonia. *Trans Am Neurol Assoc*; 103:52-53.
- Kuzniecky RI y Jackson GD (1995) *Magnetic Resonance In Epilepsy*. New York: Raven Press.
- Kwan P y Brodie MJ (2005) Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy, *Epilepsia* 46 (2005), pp. 224–235

L

- Iadarola MJ, Gale K (1982). Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid. *Science*. 218.1237–1240.

- Lamberty Y y Klitgaard H** (2000) Consequences of Pentylentetrazole Kindling on Spatial Memory and Emotional Responding in the Rat. *Epilepsy Behav* 1:256-261.
- Lance JW** (1993) Current concepts of migraine pathogenesis. *Neurology* 43:S11-S15.
- Lanfumey L y Hamon M** (2000) Central 5-HT(1A) receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol*; 27(5):429-35.
- Laporte AM, Lima L, Gozlan H, Hamon M** (1994) Selective in vivo labelling of brain 5-HT1A receptors by [3H]WAY 100635 in the mouse. *Eur J Pharmacol* 271(2-3):505-14.
- Lavy S. et al., (1976)** Interictal regional cerebral blood flow in patients with partial seizures. *Neurology* 1976; 26:418-422.
- Le Bars D, et al., (1998)** High-yield radiosynthesis and preliminary in vivo evaluation of p-[18F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635, *Nuclear Medicine and Biology* 25:343-350
- Le Corre, T. Sharp, A.H. Young and P.J. Harrison** (1997) Increase of 5-HT7 (serotonin-7) and 5-HT1A (serotonin-1A) mRNA expression in rat hippocampus after adrenalectomy. *Psychopharmacol* 130: 368-374.
- Lee KJ, Jang KS, Shon YM** (2006) Chronic deep brain stimulation of subthalamic and anterior thalamic nuclei for controlling refractory partial epilepsy. *Acta Neurochir Suppl.* 2006; 99:87-91
- Lee EHY y Geyer MA** (1984) Dopamine autoreceptor mediation of the effects of apomorphine on serotonin neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 21:301-311.
- Lee HS, Kim MA, Valentino RJ, Waterhouse BD** (2003) Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res.* 963:57-71.
- Lehmkuhle MJ, Thomson KE, Scheerlinck P, Pouliot W, Greger B, Dudek FE** (2009) A simple quantitative method for analyzing electrographic status epilepticus in rats. *J Neurophysiol.* 101(3):1660-70.
- Levkovitz, Y y Segal, M** (1997) Serotonin 5-HT1A receptors modulate hippocampal reactivity to afferent stimulation. *J Neurosci* 17(14): 5591-5598.
- Lim SN, Lee ST, Tsai YT, Chen IA, Tu PH, Chen JL, Chang HW, Su YC, Wu T** (2007) Electrical stimulation of the anterior nucleus of the thalamus for intractable epilepsy: a long-term follow-up study. *Epilepsia*;48 (2):342-7.
- Little HJ, Nutt DJ, Taylor SC** (1987) Selective changes in the in vivo effects of benzodiazepine receptor ligands after chemical kindling with FG 7142. *Neuropharmacology.* 26(1): 25-31.
- Lothe A y Col** (2008) Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F]MPPF PET study. *Brain.*131(Pt 10):2765-82.
- López-Gimenez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilario MT** (1997) Selective visualization of rat brain 5-HT2A receptors by autoradiography with [3H]MDL 100,907. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356:446-454.
- Lopez-Meraz M, Gonzalez-Trujano M, Neri-Bazan L, Hong E, Rocha L** (2005) 5-HT1A receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats. *Neuropharmacology* 49:367-375.
- Lopez-Meraz ML, Martinez A, Rocha L** (2007) Effect of 8-OH-DPAT on electrographic activity during the kainic acid-induced status epilepticus in rats. *Seizure* 16:365-370.
- López-Muñoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C** (2005) The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 329-343.
- Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, et al.** (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11:449-458
- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL** (1999) It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia*: 40(1):120-2.
- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL** (1999) It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia.* 40(1):120-2.
- Lu K, Gean P** (1998) Endogenous serotonin inhibits epileptiform activity in rat hippocampal CA1 neurons via 5-hydroxytryptamine1A receptor activation. *Neuroscience* 86:729-737
- Luo X, Li D, Cen D, He Z, Meng Z, Liang L** (2009) Effect of intravenous immunoglobulin treatment on brain interferon-gamma and interleukin-6 levels in a rat kindling model. *Epilepsy Res.* 88 (2-3): 162-7
- Lüttjohann A, Paolo F. Fabene y Gilles van Luijtelaaar** (2009) A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior.* 98(5): 579-586

M

-
- Mainardi P, Leonardo A & Albano C** (2008) Potentiation of brain serotonin activity may inhibit seizure, especially in drug-resistant epilepsy. *Medical Hypotheses* 70: 876-879.
- Marcinkiewicz M., Verge D., Gozlan H., Pichat L., Hamon M** (1984) Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT₁ sites in the rat brain. *Brain Research* 291:159-163.
- Marcinkiewicz, Vergé, Gozlan, Pichat, Hamon** (1984) Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT₁ sites in the rat brain, *Brain Research* 291:159-163
- Marescaux C, Micheletti G, Vergnes M, Depaulis A, Rumbach L, Warter JM.** (1984) A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in the rat: comparison with pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia*. 25:326-331.
- Maroteaux L, Saudou F, Amlaiky N, Boschert U, Plassat JL, Hen R.** (1992) Mouse 5HT_{1B} serotonin receptor: cloning, functional expression, and localization in motor control centers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(7):3020-4
- Martin ED y Pozo MA** (2006). Animal Models for the Development of New Neuropharmacological Therapeutics in the Status Epilepticus. *Current Neuropharmacology*. 4(1):33-40
- Martín ED, Ceña V, Pozo MA.** (2005) Cholinergic modulation of status epilepticus in the rat barrel field region of primary somatosensory cortex. *Exp Neuro*. 196(1):120-5.
- Martín-Ruiz R y Ugedo L** (2001) Electrophysiological evidence for postsynaptic 5-HT_{1A} receptor control of dorsal raphe 5-HT neurones. *Neuropharmacology* 41:72-78.
- Martín ED, Araque A, Buño W** (2001). Synaptic regulation of the slow Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: possible implication in epileptogenesis. *J Neurophysiol* 86: 2878-2886
- Matheja P, et al.,** (2001) Temporal hypometabolism at the onset of cryptogenic temporal lobe epilepsy. *Eur J Nucl Med*; 28(5):625-632.
- Matsumoto H, Ajmone-Marsan C** (1964) Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: ictal manifestations. *Exp Neurol* 9:305-326.
- Mazarati AM, Baldwin RA, Sankar R, Wasterlain CG** (1988) Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. *Brain Res* ;814:179-185
- McCormick DA y Wang Z** (1991) Serotonin and noradrenaline excite GABAergic neurones of the guinea-pig and cat nucleus reticularis thalami. *J Physiol* 442:235-255.
- McCormick, D.A.** (2002) Cortical and subcortical generators of normal and abnormal rhythmicity. *Int. Rev. Neurobiol*. 49: 99-114
- McIntyre DC, Poulter MO, Gilby K.** (2002) Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res*. 50:79-92.
- Mengod, G., Pompeiano, M., Martinez Mir, MI, Palacion J** (1990). Localization of the mRNA for the 5-HT₂ receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites. *Brain Res*. 524:139-143.
- Menendez de la Prida L, Suarez F, Pozo MA.** (2003) Electrophysiological and morphological diversity of neurons from the rat subicular complex in vitro. *Hippocampus*.;13(6):728-44.
- Menéndez de la Prida L., Sola RG., Pozo MA.**(2002) Aspectos neurofisiológicos in vivo e in vitro de la epilepsia: *Rev Neurol* 34(5):430-7
- Merrill MA, Clough RW, Dailey JW, Jobe PC, Browning RA** (2007) Localization of the serotonergic terminal fields modulating seizures in the genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsy Res* 76:93-102.
- Merlet, P. Ryvlin, N. Costes, D. Dufournel, J. Isnard, I. Faillenot, K. Ostrowsky, F. Lavenne, D. Le Bars and F. Mauguière** (2004a) Statistical parametric mapping of 5-HT_{1A} receptor binding in temporal lobe epilepsy with hippocampal ictal onset on intracranial EEG, *Neuroimage* 22 , pp. 886-896.
- Merlet I, Ostrowsky K, Costes N, Ryvlin P, Isnard J, Faillenot I, Lavenne F, Dufournel D, Le Bars D, Mauguière F** (2004b) 5-HT_{1A} receptor binding and intracerebral activity in temporal lobe epilepsy: an [18F]MPPF-PET study. *Brain*;127(Pt 4):900-13.
- Miquel MC., Doucet E., Boni C., El Mestikawy S., Matthiessen L., Daval G., Verge D., Hamon, M** (1991) Central serotonin_{1A} receptors: respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by in situ hybridization histochemistry,

radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochemistry International* 19: 453e465.

- Mirrión MM, Schiffer WK, Siddiq M, Dewey. SL, Tsirka SE** (2006) PET imaging of glucose metabolism in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Synapse* 59: 119-121.
- Miller HP., Levey A. Rothstein JD., Tzingounis AV., Conn P** (1997) Alterations in glutamate transporter protein levels in kindling-induced epilepsy. *J. Neurochem.* 68, 1564–1570.
- Mokler DJ, Bronzino JD, Galler JR, Morgane PJ** (1999) The effects of median raphe electrical stimulation on serotonin release in the dorsal hippocampal formation of prenatally protein malnourished rats. *Brain Res.* 838:95-103.
- Mokler DJ, Larivière D, Johnson DW, Theriault NL, Bronzino JD, Dixon M, Morgane PJ** (1998) Serotonin neuronal release from dorsal hippocampus following electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei in conscious rats. *Hippocampus* 8:262-273.
- Molineaux, S.M., Jessell, T.M., Axel, R., et al.,**(1989). 5-HT_{1C} receptor is a prominent serotonin receptor subtype in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 793–6797.
- Molliver ME** (1987) Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J. Clin. Psychopharmacol* 7:3S–23S.
- Monti JM, Jantos H** (2006) Effects of the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 microinjected into the dorsal raphe nucleus on REM sleep in the rat. *Behav Brain Res.* 167(2):245-50.
- Moore RY., Halaris AE., Jones, BE** (1978) Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *Journal of Comparative Neurology* 180:417e438.
- Morimoto K, Fahnestock M, Racine RJ** (2004) Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol.* 73(1):1-60.
- Moshe SL., Sperber EF., Albala BJ** (1991) Kindling as a model of epilepsy in developing animals. In: F. Morrell, Editor, *Kindling and Synaptic Plasticity: The Legacy of Graham Goddard*, Birkhäuser, New York pp. 177-194.

N

- Nairismägi J, Gröhn OH, Kettunen MI, Nissinen J, Kauppinen RA, Pitkänen A** (2004) Progression of brain damage after status epilepticus and its association with epileptogenesis: a quantitative MRI study in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 45:1024-34.
- Nehlig A, Rudolf G, Leroy C, Rigoulot MA, Simpson IA, Vannucci SJ** (2006) Pentylentetrazol-induced status epilepticus up-regulates the expression of glucose transporter mRNAs but not proteins in the immature rat brain. *Brain Res*;1082(1):32-42.
- Nehlig A., Y Pereira de Vasconcelos A** (1996) The model of pentylentetrazol-induced status epilepticus in the immature rat: short- and long-term effects. *Epilepsy Res* 26(1): 93-103.
- Nehlig, A., Obenaus, A.** (2006) Imaging approaches in small animal models. En: *Models of Seizures and Epilepsy*, ed. Pitkanen, Moshe, Schwartzkroin.
- Nelson CS, Cone RD, Robbins LS, Allen CN, Adelman JP** (1995) Cloning and expression of a 5HT₇ receptor from *Xenopus laevis*. *Recept. Channel.* 3:61-70.
- Nishi H, Watanabe S, Ueki S.** (1980) Effect of median raphe stimulation on hippocampal seizure discharge induced by carbachol in the rabbit. *Jpn J Pharmacol* 30:759-762.
- Ngyuen JP, Lefauche[u]r JP, Le Guerinel C,** (2000)l. Motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. *Arch Med Res.*31:263–265.
- Nutt DJ, Taylor SC, Little HJ** (1986) Optimizing the pentetrazol infusion test for seizure threshold measurement. *J Pharm Pharmacol*; 38:697-698.
- Nuttin B, Cosyns P, Demeulemeester H, Gybels J, Meyerson B.** (1999) Electrical stimulation in anterior limbs of internal capsules in patients with obsessive-compulsive disorder. *Lancet* 1999 30; 354:1526.

O

- Okada M, Hirano T, Kawata Y, Murakami T, Wada K, Mizuno K, Kondo T, Kaneko S** (1999) Biphasic effects of zonisamide on serotonergic system in rat hippocampus. *Epilepsy Res* 34(2-3):187-197.

- Oleskevich S y Descarries L** (1990) Quantified distribution of the serotonin innervation in adult rat hippocampus. *Neuroscience* 34:19-33.
- Olsten L y Seiger A** (1972) Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observation. *Anat. Entwicklungsgesch* 137:301-316.
- Ono J, Vieth R, Walson P** (1990) Electrocorticographical observation of seizure induced by pentylenetetrazol (PTZ) injection in rat Functional. *Neurology* 5:345-352
- Osorio I, Overman J, Giftakis J, Wilkinson SB** (2007) High frequency thalamic stimulation for inoperable mesial temporal epilepsy. *Epilepsia*. 2007; 48(8):1561-71.

P

- Padou V, Boyet S, Nehlig A** (1995) Changes in transport of [¹⁴C] alpha-aminoisobutyric acid across the blood-brain barrier during pentylenetetrazol-induced status epilepticus in the immature rat. *Epilepsy Res.* 3:175-83.
- Palacios, J.M., Waeber, C., Mengod, G., et al.,** (1991) Autoradiography of 5-HT receptors: a critical appraisal. *Neurochem. Int.* 18, 17–25.
- Palchaudhuri M., y Flugge G.** (2005) 5-HT_{1A} receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res.* 321(2):159-172.
- Parks CL, Robinson P.S., Sibille E., Shenk T., Toth M** (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:10734e10739.
- Park JH, Cho H, Kim H, Kim K.** (2006) Repeated brief epileptic seizures by pentylenetetrazole cause neurodegeneration and promote neurogenesis in discrete brain regions of freely moving adult rats. *Neuroscience* 140: 673-684
- Parent A, Descarries L., Beaudet A.** (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience.* 6:115e138.
- Passchier J, van Waarde A, Doze P, Elsinga ph, Vaalburg W** (2000) Influence of P-glycoprotein on brain uptake of [¹⁸F]MPPF in rats. *European Journal of Pharmacology* 407. pp. 273–280.
- Paxinos G., y Watson C** (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates.
- Pazos A, Cortés R, Palacios JM** (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.* 346:231-249.
- Pazos A., Hoyer D., Palacios JM** (1984) The binding of serotonergic ligands to the porcine choroid plexus: characterisation of a new type of serotonin recognition site. *Eur. J. Pharmacol.* 106, 539–546.
- Pereira de Vasconcelos A, el Hamdi G, Vert P, Nehlig A.** (1992) An experimental model of generalized seizures for the measurement of local cerebral glucose utilization in the immature rat. II. Mapping of brain metabolism using the quantitative [¹⁴C]2-deoxyglucose technique. *Brain Res Dev Brain Res.* 69(2):243-59.
- Pereira de Vasconcelos A, Boyet S, Koziel V, Nehlig A** (1995) Effects of pentylenetetrazol-induced status epilepticus on local cerebral blood flow in the developing rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15(2):270-83.
- Pellerin L, et al.,** (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:10625-9.
- Perićić D, Svob Strac D** (2007) The role of 5-HT₇ receptors in the control of seizures. *Brain Res.* 1141:48-55
- Perićić D, Lazić J, Jembrek M, Švob Štrac D** (2005) Stimulation of 5-HT_{1A} receptors increases the seizure threshold for picrotoxin in mice. *European Journal of Pharmacology* 527:105-110
- Perryman KM, Babb TL, Finch DM, Brown WJ, Crandall PH.** (1980) Effects of long-term raphe nucleus stimulation on chronic limbic seizures in monkeys. *Epilepsia* 21:479-487.
- Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C, Jouvet M** (1996) Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.* 364:402-413.

- Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH** (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *methods. Neuroscience* 82:443-468.
- Phelps ME** (2002) PET: the emerging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med* 2000;41:661-81.
- Pineau N, Charriaut-Marlangue C, Motte J, Nehlig A** (1999) Pentylenetetrazol seizures induce cell suffering but not death in the immature rat brain *Developmental Brain Research* 112:139-144.
- Piñeyro G, de Montigny C, Weiss M, Blier P** (1996) Autoregulatory properties of dorsal raphe 5-HT neurons: possible role of electrotonic coupling and 5-HT_{1D} receptors in the rat brain. *Synapse*. 22(1):54-62.
- Piñeyro, G y Blier, P** (1999) Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacological Reviews* .51:533-591.
- Peñuelas I** (2002) Fundamentos metabólicos de la aplicación de los radiofármacos PET. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat*, 96 (1-2): 59-79.
- Plénevaux, et al.**, (2000a) Tissue distribution, autoradiography, and metabolism of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2' -[N-2"-pyridinyl)-p-[(18)F]fluorobenzamido]ethyl]piperazine (p-[(18)F]MPPF), a new serotonin 5-HT_{1A} antagonist for positron emission tomography: an in vivo study in rats, *Journal of Neurochemistry* **75** (2000), pp. 803–811.
- Plénevaux A, et al.**, (2000b) [18F]p-MPPF: a radiolabelled antagonist for the study of 5-HT_{1A} receptors with PET. *Nuclear Medicine and Biology*. 27:467–471
- Pompeiano M., Palacios J.M., Mengod, G** (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *The Journal of Neuroscience* 12:440e453.
- Pollak P, Fraix V, Krack P, et al** (2002). Treatment results: Parkinson's disease. *Mov Disord* 2002.17 Suppl 3:S75–S83.
- Porter RJ., Lunn BS., Walker LL., Gray JM., Ballard CG., O'Brien JT.** (2000) Cognitive deficit induced by acute tryptophan depletion in patients with Alzheimer's disease. *American Journal of Psychiatry*. 157:638e640.
- Pouzet B** (2002) SB-258741: a 5-HT₇ receptor antagonist of potential clinical interest. *CNS Drug Rev*. 8(1):90-100.
- Pranzatelli MR y Nadi NS** (1995) Mechanism of action of antiepileptic and antimyoclonic drugs. *Adv Neurol*.67:329-60.

R

- Racine RJ** (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 32:269-279.
- Racine RJ** (1978) Kindling: the first decade. *Neurosurgery*. 3; 234-252.
- Radja, F., Laporte, A.-M., Daval, G., et al.**, (1991) Autoradiography of serotonin receptor subtypes in the central nervous system. *Neurochem. Int*. 18, 1–15.
- Rbah, et al.**, (2003) Displacement of the PET ligand 18F-MPPF by the electrically evoked serotonin release in the rat hippocampus, *Synapse* 49 (2003), pp. 239–245.
- Ramsay RE, Uthman BM, Augustinsson LE, Upton AR, Naritoku D, Willis J, Treig T, Barolat G, Wernicke JF** (1994) Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 2. Safety, side effects, and tolerability. First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. *Epilepsia* 35:627– 636.
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R** (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*.95:14476e14481.
- Ramón y Cajal S** (1911) Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres II. Paris: Malone.
- Ramsay RE, Uthman BM, Augustinsson LE, et al** (1994) First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 2. Safety, side-effects, and tolerability. *Epilepsia*.35:627– 636.
- Rbah L, Leviel V, Zimmer L** (2003) Displacement of the PET ligand 18F-MPPF by the electrically evoked serotonin release in the rat hippocampus. *Synapse*. 49(4):239-45.

- Reznikov, K. Y.** (1991). Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus. En: *Advances in Anatomy Embriology and Cell Biology* 122. Springer—Verlag
- Riad M, Zimmer L, Rbah L, Watkins KC, Hamon M, Descarries L** (2004) Acute Treatment with the Antidepressant Fluoxetine Internalizes 5-HT_{1A} Autoreceptors and Reduces the In Vivo Binding of the PET Radioligand [18F]MPPF in the Nucleus Raphe Dorsalis of Rat. *J. Neurosci.* 24: 5420-5426
- Risinger MW, Engel J Jr, Van Ness PC, Henry TR, Crandall PH** (1989) Ictal localization of temporal lobe seizures with scalp/sphenoidal recordings. *Neurology*.39(10):1288-93.
- Roberts C, Price GW, Gaster L, Jones BJ, Middlemiss DN, Routledge C** (1997) Importance of h5-HT_{1B} receptor selectivity for 5-HT terminal autoreceptor activity: an in vivo microdialysis study in the freely-moving guinea-pig. *Neuropharmacology*. 36(4-5):549-57.
- Rodríguez, Broglio, Jiménez-Moya, Durán, Álvarez, Gómez, González, Ocaña, Salas** (2006). *Laboratorio de Psicobiología. Facultad de Psicología. Universidad de Sevilla.* Mc Graw Hill.
- Rocha L, Lorigados-Pedre L, Orozco-Suárez S, Morales-Chacón L, Alonso-Vanegas M, García-Maeso I, Villeda-Hernández J, Osorio-Rico L, Estupiñán B, Quintana C** (2007). Autoradiography reveals selective changes in serotonin binding in neocortex of patients with temporal lobe epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31(6): 1208-1218.
- Romero L, Ildefonso H, Artigas F** (1996) The 5-HT_{1A} antagonist WAY-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of serotonergic antidepressants in rat brain. *Neuroscience Letters*. 219:123-126
- Rojo P, Caicoya AG, Martín-Loeches M, Sola RG, Pozo MA.** (2001) Localization of the epileptogenic zone by analysis of electroencephalographic dipole. *Rev Neurol*;32(4):315-20
- Rojo P** (2003) Localización de la zona irritativa mediante la técnica de dipolos electroencefalográficos aplicada a la actividad intercrítica en pacientes con epilepsia farmacorresistente. Tesis doctoral Facultad de Medicina - Universidad Complutense de Madrid.
- Romero AL** (1998) Bases neurobiológicas de la acción de los fármacos antidepresivos: papel de los autorreceptores 5-HT_{1a}. Tesis doctoral, Universitat de Barcelona. Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica
- Ropert, N** (1988) Inhibitory action of serotonin in CA1 hippocampal neurons in vitro. *Neuroscience* 26:69-81
- Roth BL, Craig SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma FJ Jr, Shen Y, Meltzer HY, Sibley DR** (1994) Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268:1403-1410.

S

- Sakai K, Salvat D, Touret M, Jouvet M** (1977) Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res.* 137:11-35.
- Salas-Puig J, Gil-Nagel A** (2004) La clasificación de las crisis y síndromes epilépticos: nuevas propuestas. *Rev Neurol.* 19 (2): 59-66.
- Salgado D, Alkadhi KA** (1995) Inhibition of epileptiform activity by serotonin in rat CA1 neurons. *Brain Res* 669:176-182.
- Salgado-Commissariat y Alkadhi KA** (1997) Serotonin inhibits epileptiform discharge by activation of 5-HT_{1A} receptors in CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology*. 36(11-12), 1705-1712.
- Sato K., Morimoto K., Okamoto M** (1988) Anticonvulsant action of a non-competitive antagonist of NMDA receptors (MK-801) in the kindling model of epilepsy. *Brain Res.* 463:12-20.
- Savic I, et al.,** (2004): Limbic reduction of 5-HT_{1A} receptor binding in human temporal lobe epilepsy. *Neurology* 62: 1343-1351.
- Schickervá R, Mares P, Trojan S** (1984) Correlation between electrocorticographic and motor phenomena induced by pentamethylenetetrazol during ontogenesis in rats. *Exp Neurol*;84(1):153-64.
- Schmitz D, Empson RM, Heinemann U** (1995) Serotonin reduces inhibition via 5-HT_{1A} receptors in area CA1 of rat hippocampal slices in vitro. *Journal of Neuroscience*. 15: 7217-7225.

- Schweinhardt P, Fransson P, Olson, L, Spenger C, Andersson JL** (2003). A template for spatial normalisation of MR images of the rat brain. *J Neurosci Methods*. 129:105-13.
- Scott RC, King MD, Gadian DG, Neville BG, Connolly A** (2003) Hippocampal abnormalities after prolonged febrile convulsion: a longitudinal MRI study. *Brain*. 126: 2551-7.
- Segal M** (1975). Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Res*. 94:115–131
- Segal M** (1982) Modulators of neural activity in the hippocampus, in: S. Corkin. Ed, *Alzheimer's Disease: A Report of Progress*, Raven Press, New York, pp. 213–222.
- Selberg O, et al.**, (2002) Use of positron emission tomography for the assessment of skeletal muscle glucose metabolism. *Nutrition*. 18:323-8.
- Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS** (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol*. 290: 213-242.
- Sharp T, Bramwell SR, Hjorth S, Grahame-Smith DG** (1989) Pharmacological characterization of 8-OH-DPAT-induced inhibition of rat hippocampal 5-HT release in vivo as measured by microdialysis. *Br.J. Pharmacol*. 98: 989–997
- Sheard, N.H y Zolovick, AJ** (1971) serotonin: release in cat brain and cerebrospinal fluid on stimulation of midbrain raphe. *Brain res*. 26, 455-458
- Shields, PJ y Eccleston, D** (1972) effects of electrical stimulation of rat midbrain on 5hydroxytryptamine synthesis as determined by a sensitive radioisotope method. *J. Neurochem*. 19, 265-272
- Shiue CY, Shiue GG, Mozley PD, Kung MP, Zhuang ZP, Kim HJ, Kung HF** (1997) P-[18F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT1A receptors in humans. *Synapse*. 25:147–154.
- Sierra-Paredes G, Sierra-Marcuño G** (2007) Extrasynaptic GABA and glutamate receptors in epilepsy. *CNS neurological disorders drug targets* 6(4):288-300.
- Sleight AJ, Carolo C, Petit N, Zwingelstein C, Bourson A** (1995) Identification of 5-hydroxytryptamine (7) receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Mol. Pharmacol*. 47:99-103.
- Snead OC** (1995) Basic mechanisms of generalized absence seizures. *Ann Neurol* 37:146-157
- Snead OC, Banerjee PK, Burnham M, Hampson D** (2000). Modulation of absence seizures by the GABAAR: A critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci*. 20:6218–6224
- Spencer SS** (2002) When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically?. *Lancet Neurol*. 1:375-382.
- Sprouse JS y Aghajanian GK** (1988) Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT1A and 5-HT1B agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology*. 7:707-15.
- Sotelo C, Cholley B, Mestikawy SE, Gozlan H, Hamon M**(1990) Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT1A autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur. J. Neurosci*. 12:1144-1154.
- Statnick MA, Dailey JW, Jobe PC, Browning RA** (1996) Abnormalities in brain serotonin concentration, high-affinity uptake, and tryptophan hydroxylase activity in severe-seizure genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia* 37:311-321.
- Steckler T y Sahgal** (1995) The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognitive behaviour. *Behaviour Brain Research* 67:165e199.
- Steriade M., McCormick DA., Sejnowski TJ** (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science*. 262:679-685.
- Stern WC, Johnson A, Bronzino JD, Morgane PJ** (1981) Neurpharmacology of the afferent projections from the lateral habenula and substantia nigra to the anterior raphe in the rat. *Neuropharmacology* 20:979-989.
- Stowe RL y Barnes NM** (1998) Cellular distribution of 5-HT7 receptor mRNA in rat brain. *Br. J. Pharmacol*. 123:229P.
- Shulman RG, et al.**, (2004) *Brain Energetics and Neuronal Activity*. John Wiley & Sons, Ltd, England.
- Szyndler J, Maciejak P, Turzyńska D, Sobolewska A, Bidziński A, Płaźnik A** (2010) Time course of changes in the concentrations of monoamines in the brain structures of pentylenetetrazole-kindled rats. *J Neural Transm*. 117(6):707-18.

T

-
- Takagishi M y Chiba T** (1991) Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. *Brain Res.* 566:26-39.
- Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, Dallman MF, Julius D.** (1995) Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature* 374:542-546
- Theodore W** (2003) Does Serotonin Play a Role in Epilepsy? *Epilepsy Currents* 3:173-177.
- Theodore W y Fisher R.** (2004) Brain stimulation for epilepsy. *Lancet Neurol.* 111-118.
- Theodore WH, et al.,** (2004) Epilepsy duration, febrile seizures, and cerebral glucose metabolism. *Epilepsia* 2004; 45(3):276-279.
- The Vagus Nerve Stimulation Study Group (1995)** A randomized controlled trial of chronic vagus nerve stimulation for treatment of medically intractable seizures. *Neurology*: 45:224-230.
- Thon M, Sisodiya, Najm I** (2008) Neuropathology of epilepsy. En In loves S, Louis DN, Ellison DW, Eds. *Greenfield neuropathology*, vol 1.8 ed. London: Hodder Arnold.833-87
- Thielen RJ y Frazer A** (1995) Effects of novel 5-HT_{1A} receptor antagonists on measures of post-synaptic 5-HT_{1A} receptor activation in vivo. *Life Science* 56:163-168.
- Thielen R.J. Fangon NB, Frazer A** (1996) 4-(2'-Methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]ethyl] piperazine and 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-[N-(2"-pyridinyl)-p-fluorobenzamido]ethyl]piperazine, two new antagonists at pre- and postsynaptic serotonin-1A receptors, *Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics* 277:661-670.
- Tenney JR, Duong TQ, King JA, Ludwig R, Ferris CF** (2003) Corticothalamic modulation during absence seizures in rats: a functional MRI assessment. *Epilepsia.* 44(9):1133-40.
- Tenney JR, Duong TQ, King JA, Ferris CF** (2004) fMRI of brain activation in a genetic rat model of absence seizures. *Epilepsia*;45(6):576-82.
- To Z.P., Bonhaus D.W., Eglen R.M., Jakeman L.B** (1995) Characterisation and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea pig brain. *Br. J. Pharmacol.* 115:107-116.
- Toghi H, Abe T, Takahashi S, Kimura M, Takahashi J, Kikushi T** (1992) Concentrations of serotonin and its related substances in the cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer type dementia. *Neurosci. Lett.* 141:9-12.
- Tohyama, et al.,** (2007) Acute flesinoxan treatment produces a different effect on rat brain serotonin synthesis than chronic treatment: an alpha-methyl-L-tryptophan autoradiographic study, *Neurochem. Int.* **51** (8).
- Tohyama, et al.,** (2002) Effects of serotonin receptors agonists, TFMPP and CGS12066B, on regional serotonin synthesis in the rat brain: an autoradiographic study, *J. Neurochem.* **80** (5)pp. 788-798
- Tohyama, et al.,** (2001) Effects of selective 5-HT_{1A} receptor antagonists on regional serotonin synthesis in the rat brain: an autoradiographic study with alpha-[¹⁴C]methyl-L-tryptophan, *Eur. Neuropsychopharmacol.* **11** (3) pp. 193-202
- Törk I** (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 600:9-34.
- Traub RD, Miles R, Jefferys JG** (1993). Synaptic and intrinsic conductances shape picrotoxin-induced synchronized afterdischarges in the guinea-pig hippocampal slice. *J Physiol* 461:525-547.
- Treiman DM** (1989) Pharmacokinetics and clinical use of benzodiazepines in the management of status epilepticus. *Epilepsia*;30(S2):S4-S10
- Tuunanen J y Pitkänen A** (2000) Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling? *Epilepsy Res.* 39(2):171-6.

U

-
- Uthman B, Wilder BJ, Penry JK, et al.** (1993) Treatment of epilepsy by stimulation of the vagus nerve. *Neurology*; 43:1338-1345.
- Upton N, Stean T, Middlemiss D, Blackburn T, Kennett G.** (1998) Studies on the role of 5-HT_{2C} and 5-HT_{2B} receptors in regulating generalised seizure threshold in rodents. *Eur J Pharmacol* 359:33-40

V

-
- Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS** (1997) 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J. Neurosci.* 17(8): 2785–2795.
- Van Bogaert, X. De Tiege, J.M. Vanderwinden, P. Damhaut, S.N. Schiffmann and S. Goldman** (2001) Comparative study of hippocampal neuronal loss and in vivo binding of 5-HT_{1A} receptors in the KA model of limbic epilepsy in the rat, *Epilepsy Research* **47**, pp. 127–139.
- Van Vliet EA, et al.,** (2007) Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*; Feb 130(Pt 2):521–34.
- Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE** (2000) 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects, *Trends Pharmacol. Sci.* 21:70–77.
- Vane JR** (1959) The relative activities of some tryptamine analogues on the isolated rat stomach strip preparation. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 14:87–98.
- Velasco M, Velasco F, Velasco AL, Boleaga B, Jimenez F, Brito F, Marquez I.** (2000) Subacute electrical stimulation of the hippocampus blocks intractable temporal lobe seizures and paroxysmal EEG activities. *Epilepsia* 41:158–169
- Velíšková J** (2006) Chapter 48 - *Behavioral Characterization of Seizures in Rats* In Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) *Models of Seizures and Epilepsy* Elsevier, Amsterdam.
- Velíšek L** (2006) Chapter 11 - *Models of Chemically-Induced Acute Seizures*. In Asla Pitkänen., Schwartzkroin PA, Moshé SL, (Eds) *Models of Seizures and Epilepsy* Elsevier, Amsterdam.
- Vertes RP** (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32–58.
- Voigt MM, Laurie DJ, Seeburg PH, Bach A** (1991) Molecular cloning and characterization of a rat brain cDNA encoding a 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor. *EMBO J.* 10(13):4017–23.

W

-
- Wada Y, Shiraishi J, Nakamura M, Koshino Y** (1997) Role of serotonin receptor subtypes in the development of amygdaloid kindling in rats. *Brain Res* 747:338–342.
- Wada Y, Hirao N, Shiraishi J, Nakamura M, Koshino Y** (1999) Pindolol potentiates the effect of fluoxetine on hippocampal seizures in rats. *Neurosci Lett* 267:61–64.
- Wada Y, Nakamura M, Hasegawa H, Yamaguchi N** (1993) Intra-hippocampal injection of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) inhibits partial and generalized seizures induced by kindling stimulation in cats. *Neurosci Lett* 159:179–182.
- Wade PR, Tamir H, Kirchgessner AL, Gershon MD** (1994) Analysis of the role of 5-HT in the enteric nervous system using anti-idiotopic antibodies to 5-HT receptors. *Am J Physiol.*; 266(3 Pt 1):G403–16.
- Watanabe K, Ashby CR Jr, Katsumori H, Minabe Y** (2000) The effect of the acute administration of various selective 5-HT receptor antagonists on focal hippocampal seizures in freely-moving rats. *Eur J Pharmacol.* 398(2):239–46.
- Weller A y Mostofsky DI.** (1995) Ontogenetic development and pentylentetrazol seizure thresholds in rats. *Physiol Behav.* 57(4):629–31.
- Westbrook GL** (2000) Seizure and Epilepsy. In Kandel ER, Schwartz JH, T.M J, (Eds) *Principles of Neural Science.* 4th ed. McGraw-Hill, New York; 910–935.
- Whitaker-Azmitia P.M.** (2001) Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin.* 56:479e485.
- Witkin JM, Baez M, Yu J, Barton ME, Shannon HE.** (2007) Constitutive deletion of the serotonin-7 (5-HT₇) receptor decreases electrical and chemical seizure thresholds *Epilepsy Res.* 75(1):39–45.
- Wilson MA y Molliver ME** (1991) The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates retrograde transport studies. *Neuroscience* 44:555–570
- Williamson PD, French JA, Thadani VM, Kim JH, Novelly RA, Spencer SS, Spencer DD, Mattson RH** (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal

scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann Neurol.* 34(6):781-7.

Wolf OT, Dyakin V, Patel A, Vadasz C, de Leon MJ, McEwen BS, Bulloch K (2002) Volumetric structural magnetic resonance imaging (MRI) of the rat hippocampus following kainic acid (KA) treatment. *Brain Res.* 934: 87-96.

Woodbury DM, Woodbury JW (1990) Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. *Epilepsia* 31[Suppl 2]:S7–S19.

Woolley D.W. (1962) *The Biochemical Basis of Psychosis or the Serotonin Hypothesis About Mental Disease.* John Wiley and Sons, New York.

Y

Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ (1990) *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis.* New York. Raven Press

Z

Zhao Q, Holmes GL (2006) Repetitive seizures in the immature brain. In: Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé S, editors. *Models of Seizures and Epilepsy.* Elsevier Academic Press. 341–350.

Zilles et al., (1999) Ionotropic glutamate and GABA receptors in human epileptic neocortical tissue: quantitative in vitro receptor autoradiography, *Neuroscience* **94** (1999), pp. 1051–1061